

Contribution à l'Etude
des Granulations des Mégacaryocytes
Métachromasie ou Double coloration ?

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE
DE L'UNIVERSITÉ DE GENÈVE
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR
Eugène GERONIMI
de Seewis 1/0., Grisons

MÉDECIN DIPLÔMÉ DE LA CONFÉDÉRATION SUISSE

Thèse N° 1355.

LAUSANNE
IMPRIMERIE T. GENEUX

1931

Contribution à l'Étude
des Granulations des Mégacaryocytes
Métachromasie ou Double coloration ?

THÈSE

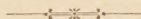
PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE
DE L'UNIVERSITÉ DE GENÈVE
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Eugène GERONIMI

de Seewis i/ O., Grisons

MÉDECIN DIPLÔMÉ DE LA CONFÉDÉRATION SUISSE



Thèse N° 1355.

LAUSANNE
IMPRIMERIE T. GENEUX

1931

*La Faculté de Médecine, sur le préavis favorable
de M. le Professeur M. Askanazy, autorise l'impres-
sion de la présente thèse, sans prétendre par là émet-
tre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.*

Genève, le 12 novembre 1930.

Le Doyen : Prof. E. BUJARD.

QU'IL ~~me~~ SOIT PERMIS D'EXPRIMER ICI
A MONSIEUR LE PROFESSEUR DOCTEUR
M. ASKANAZY

TOUTE ~~ma~~ GRATITUDE POUR LA BIENVEILLANCE
QU'IL ~~me~~ A TÉMOIGNÉE ET
POUR LES PRÉCIEUX CONSEILS DONNÉS
AU COURS DE CE TRAVAIL.

JE TIENS AUSSI A REMERCIER MONSIEUR
LE DOYEN PROFESSEUR DOCTEUR
E. BUJARD
DE M'AVOIR MIS A DISPOSITION DIVERS
OUVRAGES QUI ONT FACILITÉ CETTE ÉTUDE.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A mes chers parents

INTRODUCTION

Nous avons abordé l'étude de la coloration des mégacaryocytes pour trois raisons. D'abord parce que la plupart des auteurs qui se sont occupés de la moelle osseuse ne font pas allusion aux granulations de ces éléments ; d'autres savants nient même l'existence de ces granulations. Nous préciserons, au cours de ce travail, dans quelles conditions nous pouvons les mettre nettement en évidence.

Deuxième raison : nous voulions nous rendre compte si les nuances spéciales, décrites à ces granulations et obtenues avec certains colorants considérés comme métachromatiques, relèvent de la vraie métachromasie ou si ce sont simplement des doubles colorations (Doppelfärbung des auteurs allemands).

Enfin, il était intéressant de savoir si ces nuances caractéristiques, obtenues seulement en préparations fraîches après adjonction de certaines matières colorantes, pouvaient être reproduites sur des mégacaryocytes en coupe.

GÉNÉRALITÉS

Variétés d'aspect de la moelle osseuse.

Tant que la pièce squelettique est formée de cartilage, la moelle osseuse fait défaut. Elle apparaît seulement avec le premier point d'ossification : *moelle embryonnaire* (moelle primaire). Celle-ci est d'aspect gélatineuse, de couleur rouge. Cette moelle est essentiellement formée par des cellules conjonctives anastomosées en réseau, au sein d'une substance fondamentale (Branca). On y trouve encore des ostéoblastes, des ostéoclastes, des érythroblastes embryonnaires. A cette moelle primaire, essentiellement douée de propriétés ossifiantes, succède, chez le fœtus, dans les derniers mois de la vie intra-utérine, une moelle rouge aussi portant le nom de *moelle rouge* ou moelle sanguine en raison de sa richesse en vaisseaux et surtout en cellules sanguines.

Peu à peu, pendant la croissance du jeune enfant (depuis la deuxième ou troisième année déjà, d'après le professeur Askanazy) apparaissent des cellules adipeuses dans la moelle rouge des os longs. De plus en plus, la moelle rouge dans ces os fait place à la *moelle jaune*. Cette transformation s'effectue suivant le sens centripète (E. Neumann) et à un âge variable selon l'os considéré. La moelle jaune est presque exsangue, ses capillaires sanguins ont diminué de nombre et de volume, et, dans les mailles qu'ils limitent, sont coulées des cellules adipeuses. Cette moelle est jaune du fait de la prédominance des cellules graisseuses.

Chez l'adolescent déjà et à plus forte raison chez l'adulte, la moelle rouge ne se rencontre plus que dans les aréoles de certains os à structure spongieuse, tels que les corps vertébraux, les côtes, le sternum, les os de la base du crâne. Les os longs par contre ne contiennent ou bien seulement de la moelle jaune ce qui est plus rare, ou bien le plus souvent un peu de moelle rouge dans l'extrémité proximale du fémur jusqu'au niveau du tiers moyen de cet os. Dans l'humérus, la moelle rouge s'étend un peu plus distalement (Askanazy et Nagoya). Tout le reste du canal médullaire est rempli de moelle jaune. Dans les cas de fracture de la diaphyse d'un os, la moelle jaune récupère, pour un certain temps, sa couleur rouge et la structure qu'elle présente chez le jeune sujet. Beaucoup d'infections (typhus, pneumonie, variole par exemple), d'intoxications diverses, s'accompagnent d'anémies, et, dans ces états ainsi que dans toutes les anémies graves à symptomatologie connue et dans l'anémie essentielle cryptogénétique (anémie pernicieuse progressive), la moelle jaune se transforme en moelle rouge sur presque toute la longueur du canal médullaire. Pour confirmer la règle, dit-on, il faut une exception : nous connaissons, en effet, l'anémie aplastique, anémie grave aussi, qui se caractérise précisément par l'absence de réaction médullaire constatable à l'autopsie (la moelle osseuse reste jaune). Cohnheim le premier, en 1876, nous a rendu attentif que, dans l'anémie pernicieuse, la moelle osseuse est partout intensivement teintée en rouge (Askanazy). Dans cette maladie les cellules adipeuses sont rares, les érythroblastes nombreux et parmi ceux-ci des mégakaryoblastes. La moelle osseuse dans la maladie de Biermer, dit Ehrlich, retourne à l'état embryonnaire. Dans ces états pathologiques, la moelle rouge se développe suivant le sens centrifuge (E. Neu-

mann). Lors de certaines anémies graves, on trouve de la moelle rouge même au niveau des points d'ossification des cartilages laryngés.

Dans les états cachectiques, on peut rencontrer en place de moelle jaune, de la *moelle gélatineuse*, d'un jaune plus foncé et d'aspect vitreux. Cette moelle gélatiniforme (terme donné par Robin), en raison de sa demi-transparence et de sa consistance analogue à celle de la gélatine, est caractérisée par le dépôt d'un liquide entre les fibrilles du réticulum de la moelle adipeuse en atrophie, et, par la présence de fibrine autour des cellules graisseuses en atrophie, le tissu hématopoïétique pouvant se présenter en quantité variable (Askanazy).

Eléments de la moelle osseuse.

Si nous examinons des coupes de fragments de moelle osseuse rouge provenant d'enfants et d'adultes, colorées par le procédé de Giemsa-Románowsky, nous constatons à l'aide de bonnes préparations les éléments suivants :

a) Des cellules à protoplasma homogène, les *myéloblastes* (nom donné par Naegeli, 1900). Ce sont des éléments mononucléaires, à noyau régulier, rond ou ovalaire, avec un cytoplasma basophile (se colore avec un colorant basique, le bleu de méthylène par exemple). Ces cellules sont surtout très nombreuses dans la moelle osseuse foetale. Dans la vie extra-utérine leur nombre diminue graduellement, à mesure que le jeune sujet avance en âge. De ces cellules basophiles prennent naissance les myélocytes.

b) Des cellules à protoplasma granuleux et à noyau rond aussi ou parfois ovalaire, les *myélocytes*. Le cytoplasma de ces cellules est granuleux et acideophile lorsque la cellule est adulte (se colore avec un colorant acide d'aniline, l'éosine par exemple). Les myélocytes jeunes par contre ont un protoplasma franchement basophile (Askanazy). Le noyau de ces jeunes éléments est pâle et pourvu de fins filaments de chromatine ; il contient en outre des nucléoles. Ces éléments sont beaucoup plus nombreux que les myéloblastes chez le grand enfant déjà et, à plus forte raison, chez l'adulte, tandis que les myéloblastes sont plus nombreux chez l'embryon et le fœtus. Le noyau du myélocyte adulte ne contient plus de nucléole et sa chromatine est plus compacte ; le noyau perd peu à peu sa forme ronde pour devenir polymorphe (leucocyte). Les granulations des myélocytes présentent des réactions différentes vis-à-vis des matières colorantes dérivées de l'aniline (Ehrlich). Aussi distingue-t-on, depuis les belles recherches de ce savant, dans le cytoplasma de ces cellules, des granulations neutrophiles, éosinophiles (acido- ou oxyphiles) et enfin des granulations basophiles.

Les myélocytes à granulations neutrophiles, *myélocytes neutrophiles* tout court, sont les plus nombreux. Leurs granulations sont les plus fines, visibles à l'aide de l'objectif à immersion seulement et se colorant avec le Giemsa d'une nuance violacée, avec le triacide d'Ehrlich d'une couleur violette.

Les myélocytes à granulations éosinophiles, *myélocytes éosinophiles*, beaucoup moins nombreux que les précédents, ont des granulations rondes, plus grosses et visibles déjà avec un fort grossissement sans l'aide de l'objectif à immersion. A l'état frais, ces granules éosinophiles sont parfois jaunâtres et sont toujours assez réfringents pour qu'on les voit sans colorant avec un éclairage modéré. A l'état frais, en ajoutant à la préparation une sol. aq. d'éosine, on constate que les granulations éosinophiles prennent la couleur rouge vermillon avant qu'un autre élément ait pris cette teinte (Askanazy).

Les granulations éosinophiles et même les neutrophiles sont déjà visibles sur des frottis de moelle osseuse colorés avec les colorants composés de May-Grunwald et de Giemsa, tandis que, comme nous le verrons plus loin, les granulations des mégacaryocytes ne peuvent être nettement aperçues qu'à l'aide de coupes très minces. Le colorant de May-Grunwald, à lui seul, n'est pas propre à donner une coloration convenable aux frottis. Il est destiné à servir de premier temps à la méthode panoptique de Pappenheim. Il fixe la préparation et met en évidence les éléments acidophiles et les granulations neutrophiles. On verse sur le frottis non fixé, seulement séché par agitation à l'air, dix gouttes de liquide de May-Grunwald frais : on couvre la préparation avec le couvercle d'une boîte de Pétri pour éviter l'évaporation de l'alcool méthylique. Après 2 ou 3 minutes, on ajoute 30 gouttes d'eau distillée neutre : on mélange bien et laisse agir une ou deux minutes. On lave à l'eau distillée. Puis on plonge la préparation, sans l'avoir séchée, dans la solution de Giemsa diluée à raison de 1-2 gouttes par cm^3 d'eau distillée neutre. Ce frottis, après une heure de coloration avec le Giemsa, nous montrera : les globules rouges en rouge, les noyaux en bleu, les granulations oxyphiles en rouge sombre, les granul. neutrophiles en rouge vif, les granulations basophiles des mastzellen en brun-violet.

Les myélocytes à granulations basophiles, *myélocytes basophiles* (Mastzellen-Myelozyten des auteurs allemands) sont toujours les moins nombreux et ont des granules plus petits que ceux des myélocytes éosinophiles, mais plus grands que les granulations neutrophiles. Sur des coupes, les granulations basophiles sont teintées en bleu par le procédé de Giemsa-Romanowski.

Par transformation du noyau rond ou ovalaire des myélocytes en noyau polymorphe, nous arrivons aux *leucocytes*. Le cytoplasma de ces derniers éléments est oxyphile et renferme aussi les trois sortes de granulations dont nous venons de parler. Seuls, parmi les éléments blancs myélogènes, ces cellules entrent, normalement, dans la circulation sanguine, tandis que les myélocytes sont les hôtes de la moelle osseuse rouge.

c) Des cellules chargées d'hémoglobine, les *normoblastes* (ou érythroblastes secondaires par opposition aux érythroblastes primaires ou embryonnaires appelés aussi mégaloblastes) et les *érythrocytes*. L'existence des cellules sanguines *nucléées* dans la moelle osseuse a été signalée, pour la première fois, par Neumann en 1868 et, Bizzozero montra leur division par mitose en 1890. On distingue de nos jours trois sortes d'érythroblastes : le normoblaste, le mégaloblaste et le microblaste. Naegeli distingue encore le macroblaste, c'est-à-dire un gros normoblaste à noyau pycnotique. Ces expressions qui font allusion à des dimensions variables, s'appliquent au diamètre variable du noyau et non pas à la superficie totale des globules rouges nucléés bien que la superficie des éléments en question varie aussi suivant la sorte considérée. Les mégaloblastes ont le noyau plus volumineux, les microblastes le plus petit (punctiforme). Il ne faut pas confondre ces expressions avec les macrocytes ou globules rouges géants sans noyau et les microcytes ou globules rouges nains. Tandis que les premiers termes s'appliquent aux globules rouges à noyau, les seconds sont réservés aux érythrocytes de dimensions anormales.

Le *normoblaste* ou érythroblaste normal est l'élément le plus facile à reconnaître. L'ensemble de cette cellule (noyau et cytoplasma) a la dimension d'un globule rouge sans noyau appelé aussi *hématie* (terme réservé au Gl. R. sans noyau nageant dans le plasma sanguin) : 7-9 micra. Le normoblaste renferme un noyau caractéristique qui est souvent bien centré (mais

il n'est pas rare de le trouver excentrique), régulièrement arrondi et à contour très net. Ce qui le distingue surtout, c'est l'intensité de sa coloration sur les préparations microscopiques (les frottis en particulier). Beaucoup plus foncé que le noyau des autres cellules, plus sombre en particulier que celui des myélocytes, ce noyau attire tout de suite l'attention, il se détache nettement sur un ensemble moins coloré. On a dit très justement que le noyau du normoblaste ressort « en tache d'encre » sur les préparations. Le plus souvent il peut être déplacé plus ou moins à la périphérie de la cellule. On trouve parfois des normoblastes en caryorhégis, avec 2-4 noyaux isolés plus petits, mais ceux-ci sont toujours intensivement teintés en rouge-violet par le Giemsa et bleu foncé par le bleu de méthylène, ce qui permet de les reconnaître tout de suite. Normalement parmi les érythroblastes, seuls les normoblastes se trouvent dans la moelle osseuse rouge. Jamais on ne rencontre dans celle-ci, en temps normal, le mégalo-blaste qui est la signature de certains états pathologiques très graves.

Le microblasté de dimensions égales ou le plus souvent plus petites que celles du normoblaste a un ou plusieurs noyaux punctiformes. Ce ou ces noyaux se colorent fortement, comme celui du normoblaste. C'est aussi une variété pathologique qu'on ne rencontre, et dans la moelle osseuse et dans la circulation, qu'au moment d'anémies sérieuses.

Le *mégalo-blaste* d'Ehrlich est aussi désigné sous le nom d'érythroblasté embryonnaire à noyau perlé ou érythroblasté primaire. C'est une cellule sanguine de grande dimension, 10-15 μ le plus souvent. Le professeur Askanazy nous dit, dans son ouvrage « Knochenmark » (Handbuch der spez. pathol. Anatomie und Histologie, Henke-Lubarsch), avoir rencontré des mégalo-blastes d'un diamètre de 20 μ et plus. Rindfleisch a même vu de ces éléments ayant 50 μ . Ces dernières grosses cellules rouges ont été appelées *gigantoblastes* par Ehrlich : elles ont un gros noyau polymorphe et parfois plusieurs noyaux. En général, un mégalo-blaste de grandeur moyenne possède un noyau très grand, arrondi ou ovale. Il occupe la plus grande partie de la cellule. Autour de lui, le plus souvent, il n'y a qu'une mince couche protoplasmique basophile. A la différence du normoblaste et du microblasté, le noyau du mégalo-blaste est pâle, faiblement teinté sur les préparations colorées et n'est pas beaucoup plus foncé que son cytoplasma. La chromatine de ce noyau forme un fin réseau : le noyau semble perlé. Il est le plus souvent centré, tandis que celui du normoblaste semble faire hernie à la périphérie de la cellule (Askanazy).

Le mégalo-blaste ne se rencontre normalement que chez l'embryon et seulement pendant la première phase provisoire de l'érythropoïèse. Comme les embryologistes nous l'enseignent, il prend naissance au niveau des îlots de Pander et de Wolf, puis aussi au niveau du foie embryonnaire et de la rate. C'est au cours de cette phase que se font les toutes premières cellules sanguines. Mais il est un fait incontestable, c'est que la moelle osseuse normale du sujet jeune ou de l'adulte et même du nouveau-né ne contient jamais cet érythroblasté embryonnaire. Dans la maladie de Biermer, non seulement la moelle osseuse héberge cette cellule, mais aussi la rencontre-t-on dans la circulation sanguine. C'est l'élément pathognomonique de l'anémie pernicieuse.

Le noyau du normoblaste disparaît par pycnose, caryorhégis et lyse intracellulaire des fragments nucléaires (corpuscules de Jolly) ; l'élément anucléé est enfin devenu un *érythrocyte*, élément apte à passer dans la circulation. Cependant, mais seulement chez le fœtus et le nouveau-né, aux premiers

jours de la naissance, on rencontre, normalement, le normoblaste, dans le torrent circulatoire.

Toutes ces cellules décrites sont des cellules libres et forment ce que l'on a appelé le parenchyme de la moelle osseuse. Par opposition aux éléments décrits ci-dessus, les suivants sont des cellules fixes : les plasmazellen et les corpuscules de Russel, les cellules adipeuses, les ostéoclastes et les mégacaryocytes.

d) Sur des coupes de moelle osseuse rouge d'adulte et même de moelle osseuse jaune et gélatineuse, on trouve fréquemment des *lymphocytes* clair-semés (E. Kaufmann). D'après les recherches de mon maître le professeur Askanazy, on rencontre assez souvent (dans un tiers des cas) dans la moelle osseuse normale des os longs d'adulte des amas lymphocytaires qu'il a appelés follicules lymphatiques de la moelle osseuse (« Lymphfollikel »). On les rencontre plus souvent dans la moelle des corps vertébraux et des côtes. D'après H. Schridde, ces lymphocytes ne seraient pas à proprement parler des éléments normaux de la moelle osseuse, car jamais la moelle osseuse infantile ne présente, en coupe, ces derniers éléments. Le professeur Askanazy fait remarquer avec raison qu'il n'est pas facile d'obtenir une série de préparations de moelle osseuse d'enfants sains : que l'absence totale de lymphocytes est difficile à prouver ; qu'il existe des variations constitutionnelles qui ne doivent pas nécessairement être considérées comme pathologiques. Il est vrai cependant que les lymphocytes y sont plus nombreux dans certains états pathologiques : dans le rachitisme, la fièvre typhoïde, on rencontre fréquemment, dans les corps vertébraux et les côtes, ces follicules lymphatiques (Askanazy) appelés aussi, mais improprement, « lymphomes » (E. Fraenkel), et, dans tous les cas de fièvre typhoïde, on les trouverait, d'après Longcope, dans le fémur.

e) Les cellules adipeuses ne se voient pas en coupe ; nous y remarquons seulement leur loge. Pour les voir, nous devons avoir recours aux préparations fraîches. Insistons sur le fait que, normalement, nous trouvons, excepté chez le tout jeune enfant, disséminées dans la moelle osseuse rouge des os spongieux, des cellules adipeuses (Askanazy).

f) Les ostéoclastes et les mégacaryocytes seront étudiés au chapitre suivant.

Nous avons omis volontairement la description du stroma, tissu conjonctif, réticulum, vaisseaux sanguins et nerfs.

g) Pour être complet dans l'énumération des cellules de la moelle osseuse, nous devons encore mentionner les *plasmazellen* (Askanazy, Nacgeli) et les cellules hyalines ou *corpuscules de Russel* (Askanazy). Les plasmazellen sont des éléments plus volumineux que les leucocytes. Elles sont souvent groupées en amas autour des vaisseaux sanguins. Leur cytoplasma est très colorable et basophile. Leur noyau est plus souvent excentrique, très clair et, à la périphérie, se voient de gros grains chromatiques. Ces cellules sont d'origine discutée.

Les *corpuscules de Russel* (Russel'sche Körperchen des auteurs allemands) sont souvent liés aux plasmazellen. Ces corpuscules arrondis et hyalins sont parfois si nombreux dans les plasmazellen que le cytoplasma et le noyau de ces dernières se trouvent déplacés à la périphérie et qu'elles sont devenues méconnaissables (Askanazy). Ces corpuscules se rencontrent aussi, par-ci par-là, à l'état libre. Ils se colorent très bien avec les couleurs acides d'aniline (Askanazy).

Rôle de la moelle osseuse.

« Les anciens disaient de la moelle osseuse qu'elle allège le tissu osseux et remplit ses cavités. Cette fonction mécanique et banale n'est pas la seule qui lui soit dévolue. » (Branca). Pour bien comprendre le rôle de la moelle osseuse, il est nécessaire d'ébaucher quelques notions générales d'érythropoïèse.

Les premières cellules sanguines (érythroblastes embryonnaires) se forment, pendant la première phase provisoire de l'érythropoïèse, au niveau des îlots sanguins d'origine mésodermique de Pander et de Wolf. Puis, au niveau du foie embryonnaire et de la rate. Ces érythroblastes primaires développés aux dépens des cellules mésodermiques sont volumineux (15 μ en moyenne).

Une seconde étape définitive *médullaire* donnera naissance aux globules rouges définitifs.

Ce qui différencie la première de la seconde phase, c'est que les organes préposés à l'érythropoïèse primitive perdent très tôt leurs fonctions, tandis que la moelle osseuse conserve pendant toute la vie son activité hémato-poïétique. L'embryologie nous enseigne que l'aire vasculaire cesse son activité vers le milieu du deuxième mois de la vie intra-utérine ; le foie commence sa fonction érythropoïétique au début du deuxième mois, la perd peu à peu dans la deuxième moitié de la vie foetale. La rate entre en fonction, au début du troisième mois et conserve son activité érythropoïétique jusqu'à la naissance. Depuis ce moment, normalement, elle n'est plus qu'un organe lymphopoïétique.

Enfin, la moelle osseuse entre en fonction, vers la fin du quatrième mois de la vie intra-utérine. Elle fabriquera non seulement des érythroblastes, mais aussi des globules blancs et des globulins. Les cellules sanguines fabriquées au début de la seconde phase de l'érythropoïèse (phase médullaire) sont des érythroblastes primaires. Mais vers le milieu de la vie intra-utérine, et, depuis ce moment toujours, la moelle osseuse ne donnera naissance qu'à des normoblastes.

À côté de la fonction érythropoïétique, avons-nous dit, la moelle osseuse possède celle de la leucopoïèse (myéloblastes, myélocytes, leucocytes).

Autre fonction : la moelle osseuse, par ses cellules conjonctives, joue un rôle dans l'édification du squelette. Elle préside à la formation du tissu osseux pendant tout le temps que dure l'ossification. Par ses ostéoblastes, elle est l'agent producteur de l'os, à côté du périoste. Par ses ostéoclastes qui tapissent le pourtour de la moelle et le canal médullaire, elle provoque la résorption partielle de l'os et réduit ainsi à ses proportions utiles la pièce squelettique.

Autre fonction : la moelle osseuse aussi bien que la rate et le foie est un filtre du sang. Les pigments peuvent être retenus par les cellules conjonctives réticulaires et les cellules endothéliales de la moelle aussi bien que par les cellules de Kupffer du foie et des éléments réticulo-endothéliaux de la rate. Mentionnons que pour certaines substances étrangères, les ganglions lymphatiques, les vaisseaux de l'écorce cérébrale et les glomérules du rein sont aptes au même degré de se charger de celles-ci transportées par le courant sanguin.

Autre fonction : Wright et d'autres auteurs ont constaté que le *périplasma des mégacaryocytes* pousse des prolongements protoplastiques (genre de pseudopodes) à travers la paroi des capillaires sanguins. Ces excroissances

s'émiettent dans leur lumière et les fragments protoplasmiques détachés constituent, d'après ces observateurs, les *plaquettes sanguines*. C'est ainsi que les globulins prendraient leur origine dans la moelle osseuse. Ces cellules incolores sont plus petites (diamètre 2-4 μ) que les hématies, et, ont un contour le plus souvent dentelé, déchiqueté, dit-on ; mais, les hématologistes sont en désaccord sur leur morphologie, car, les globulins sont des éléments extrêmement altérables qui ne peuvent être observés en état d'intégrité que dans des conditions toutes spéciales. Ces plaquettes sanguines ne sont pas, à proprement parler, des éléments de la moelle osseuse au même titre que les autres cellules dont il vient d'être question, à l'article précédent. Dans les coupes ou sur des préparations spéciales, malgré toutes les précautions, jamais on ne les rencontre ; leur fragilité en est peut-être la raison ? Dans la moelle, ce ne sont que des êtres de passage ayant comme nous l'avons dit qu'un point de départ au niveau des mégacaryocytes dont les expansions protoplasmiques plongent dans les capillaires sanguins, et, une fois détachée cette petite masse protoplasmique qui forme le globulin suit le courant circulatoire.

Les globulins de Donné (1844) ou hémato blasts de Hayem (1878) ou *plaquettes sanguines* de Bizzozero (1883) ou thrombocytes ne se voient que dans le sang circulant. Le nom proposé par le professeur Hayem n'est pas heureux, car ce terme laisse supposer que les plaquettes sanguines sont les parents des hématies, ce qui n'est plus admissible. Depuis les recherches de Wright et d'autres auteurs, nous savons que les globulins forment une famille spéciale, indépendante de la série des éléments rouges. Les globulins sont les agents actifs de la rétraction du caillot fibrineux. Il a été démontré en effet que le caillot ne se rétracte pas là où les globulins manquent

Modifications cadavériques de la moelle osseuse.

La moelle osseuse subit, très vite après l'exitus, des modifications cadavériques importantes dont il faut tenir compte si l'on ne veut pas se méprendre au cours des examens microscopiques.

Macroscopiquement, on ne remarque qu'un changement de consistance de la moelle osseuse, un ramollissement partiel, signe d'un commencement d'autolyse du tissu médullaire.

Microscopiquement, on constate, déjà avant que ce ramollissement soit apparent, des transformations profondes dans la structure fine du parenchyme. Sur des préparations de moelle osseuse fixée peu d'heures après la mort, on note, tout d'abord, la disparition des granulations des mégacaryocytes (nous l'avons observée, en général, sur la moelle osseuse fixée six à huit heures après l'exitus), tandis que les granulations neutrophiles et éosinophiles des myélocytes sont encore conservées. Les granules neutrophiles de ces derniers éléments, nous les avons encore vus sur des coupes de moelle osseuse fixée douze heures après la mort, tandis que très rarement celles des mégacaryocytes. Puis, plus tard, après un laps de temps variant avec la saison et la maladie dont souffrait l'individu, on enregistre la disparition des granulations neutrophiles. Et enfin, les granulations éosinophiles elles-mêmes subissent le même sort.

On rencontre, d'autre part, dans chaque moelle rouge, peu d'heures après la mort, des cristaux microscopiques, en forme d'aiguille aimantée, et de figure hexagonale en coupe transversale, appelés cristaux de Charcot-Neumann (ou de Robin-Leyden). Schridde propose, pour simplifier les choses et

marquer leur origine probable, de les appeler « *cristaux éosinophiles* ». Ces cristaux se voient, en effet, tantôt en petit nombre, tantôt en masse, proportionnellement au nombre d'éléments éosinophiles. Autre raison : ces cristaux se colorent intensivement en rouge avec l'éosine (H. Schridde). Ces constatations ont amené quelques pathologistes à considérer ces cristaux comme dérivés des granulations éosinophiles. A l'encontre de cette théorie, nous exposons notre manière de voir :

a) Les cristaux de Charcot-Neumann ne se voient que chez l'homme et le singe, tandis que les éléments à granulations éosinophiles sont largement répandus dans le sang et les organes hématopoïétiques, à travers la série animale.

b) D'après le professeur Askanazy, les cristaux de Charcot-Neumann ne se colorent pas si vite et si intensivement en rouge avec l'éosine comme les granulations oxyphiles des myélocytes et des leucocytes.

c) Avec la sol. de Giemsa, suivant le temps de coloration, ces cristaux, sur les frottis, ne prennent, au début, pas la couleur ; puis, la teinte bleutée ou verdâtre. Sur les coupes, ces cristaux sont colorés avec le Giemsa d'un gris-bleu ou lilas, tandis que les granulations éosinophiles sont franchement rouges. Nous voyons donc que ces cristaux ne sont pas très acidophiles et pour appuyer nos dires, nous faisons encore remarquer :

d) Que ces cristaux se colorent bien avec la fuchsine basique ; ils prennent alors une couleur rouge sombre (Askanazy).

e) D'autre part, par la méthode de la coloration de Gram-Weigert, ces cristaux prennent ou bien totalement ou bien au centre seulement, une teinte bleu-foncé (Liebreich), tandis que les granulations éosinophiles ne prennent pas cette teinte.

f) Le professeur Askanazy et d'autres auteurs n'ont pas remarqué une diminution des granulations éosinophiles dans les cellules contenant des cristaux de Charcot-Neumann.

g) Il faut encore signaler que des cristaux de Charcot peuvent se rencontrer dans des cellules de la moelle osseuse qui ne contiennent pas de granulations éosinophiles.

Nous en concluons qu'il existe des rapports étroits entre les myélocytes et leucocytes éosinophiles d'une part et les cristaux de Charcot d'autre part ; mais nous rejetons l'identité chimique entre ces granulations oxyphiles et ces cristaux.

Les cristaux de Charcot-Neumann se voient en abondance dans le sang et la moelle rouge des leucémiques (Neumann, Magitot et Charcot). Ils sont, à l'autopsie, le plus souvent extracellulaires ; parfois on les trouve dans les éléments éosinophiles et même dans d'autres dépourvus de granulations (Askanazy et Ch. Cohn).

La formation de ces cristaux dépendrait plutôt de l'autolyse que de la putréfaction.

Pour se mettre à l'abri des erreurs lors de l'examen des mégacaryocytes, nous avons prélevé la moelle osseuse aussi vite que possible après l'exitus (4-12 heures). Pour étudier avantageusement les mégacaryocytes, il est indiqué d'examiner des fragments de moelle osseuse rouge, bien que la moelle jaune en contienne aussi, car ces éléments sont beaucoup plus nombreux dans cette première. Au cours de notre étude, nous avons le plus souvent pris la moelle osseuse sur des côtes et sur le fémur (au niveau du tiers supérieur de cet os), parfois sur le tibia. Comme nous l'avons vu, on trouve presque toujours de la moelle rouge dans l'extrémité proximale du fémur.

LES MÉGACARYOCYTES

Nomenclature.

Ch. Robin ne faisait pas encore de différence entre les *mégacaryocytes* et les cellules qu'il appelait *myéloplaxes* (1849). Bizzozero et E. Neumann furent les premiers à voir des différences entre ces deux types de cellules géantes. Mais leurs noms devenus classiques ont été donnés, plus tard, par d'autres auteurs.

Le myéloplaxe (plaque médullaire) fut appelé dans la suite par Kölliker *ostéoclaste*, dénomination demeurée classique et qui en même temps est très significative. Les ostéoclastes se voient constamment, en effet, à la surface des lamelles osseuses en voie de résorption et y sont d'autant plus nombreux que la résorption est plus intense (L. Testut). En France, on se sert encore toujours du terme myéloplaxe. Les ostéoclastes ont encore d'autres synonymes : *cellules à noyaux multiples* (John Müller) ; Howell leur a donné le nom de *polycaryocytes*.

Le terme de *mégacaryocytes* donné par Howell (1890), classique, est utilisé pour désigner un autre genre de cellule que nous allons étudier. Ses synonymes sont les suivants : *cellule géante de Bizzozero* ou encore *cellule à noyau bourgeonnant* ou à noyau polymorphe.

Différences entre l'ostéoclaste et le mégacaryocyte.

L'*ostéoclaste* est une large plaque protoplasmique finement et uniformément granuleuse (L. Testut) renfermant un nombre plus ou moins considérable de noyaux (jusqu'à 30 et plus). La forme de cet élément est multiple : arrondie, ovale, polygonale. Les contours sont irréguliers et présentent souvent une série d'expansions protoplasmiques. Les dimensions de son corps cellulaire sont volumineuses, 30-60 μ en moyenne, mais on connaît des éléments d'un diamètre de 100 μ ; épaisseur 6-7 μ . D'après L. Testut, sur tous les points du corps cellulaire du polycaryocyte se trouvent parsemées des granulations grisâtres très fines, solubles dans l'acide acétique. D'après Branca, le cytoplasma de cette cellule loge un appareil de E. Holmgren et se montre parfois muni d'une bordure striée et contient des granulations graisseuses. Pour nous, l'ostéoclaste contient, parfois seulement, des granulations qui sont probablement graisseuses. Elles sont visibles avec un fort grossissement sans l'aide de l'immersion, de l'ordre de grandeur des éosinophiles. Pour mettre ces granules en évidence, on peut, comme nous l'a montré le professeur Askanazy, détacher la dure-mère de la table interne de la voûte crânienne d'un nouveau-né, puis râcler avec un scalpel la face externe de cette membrane et examiner le produit de raclage dans la solution de Ringer. Le professeur Askanazy a reconnu, en 1902, que le protoplasma de l'ostéoclaste est basophile, et, cette basophilie persisterait pendant toute la vie de cet élément.

Les noyaux de l'ostéoclaste sont ovoïdes (diamètre 7-10 μ), réfrin-

gents, et chacun d'eux contient des nucléoles. Ces noyaux peuvent être tantôt réunis au centre, tantôt épars sans ordre dans la masse protoplasmique. Souvent ils se disposent sur des plans différents.

Les polycaryocytes se rencontrent de préférence dans les aréoles du tissu spongieux, moins dans l'endoste du canal médullaire des os longs d'adulte. L'endoste des os longs jeunes en contient constamment.

Les mégacaryocytes, comme les coupes de la moelle osseuse nous le montrent, sont très souvent appliqués contre les vaisseaux sanguins. Ces cellules géantes de Bizzozero n'apparaissent que chez les mammifères et jamais chez les animaux qui gardent toute leur vie durant des érythroblastes dans la circulation (Geelmuiden, Wright). D'origine extravasculaire, le mégacaryocyte passe normalement toute son existence dans la moelle osseuse (Askanazy, Schridde, Naegeli). Au cours de différentes maladies aiguës cependant (dans la plupart des pneumonies par exemple), des mégacaryocytes passent dans la circulation et s'arrêtent au niveau des capillaires pulmonaires et rarement au niveau des capillaires d'autres organes. Fréquemment on ne retrouve dans ces capillaires que le noyau du mégacaryocyte (Aschoff). Ed. Kaufmann a même rencontré des mégacaryocytes dans les capillaires pulmonaires lors de stase pulmonaire. Ces éléments meurent et sont phagocytés *in loco* ou envahis par le tissu conjonctif.

Le mégacaryocyte dont la structure sera étudiée en détail, plus loin, est un élément mononucléaire.

Nous donnons, en résumé, réunis en un tableau synoptique, les caractères différentiels entre ces deux éléments :

Mégacaryocytes.

Ostéoclastes.

<i>Localisation :</i>	Appliqués le plus souvent contre les vaisseaux, plus rarement contre les travées osseuses.	Appliqués à la surface des travées osseuses, parfois aussi au contact d'une anse vasculaire, en rapport avec son endothélium.
<i>Grandeur :</i>	Diamètre : 20-40 μ en moyenne ; épaisseur 7 μ .	15-20 μ en moyenne ; mais aussi 40-60 μ et plus dans les formes développées ; épaisseur : 7 μ .
<i>Noyaux :</i>	Unique et polymorphe. Diamètre du noyau : presque toujours plus de 10 μ . Il peut y avoir plusieurs fragments de noyau, mais réunis par des filaments de chromatine. C'est toujours un noyau polymorphe et très grand (mégacaryocyte).	Noyaux ovoïdes et toujours multiples (5-30 et plus) ; noyaux bien séparés (polycaryocyte). Diamètre des noyaux : 5-7 μ , en moyenne.

- Protoplasma* : Cytoplasma très peu réfringent ; à l'état frais passe inaperçu. Faible basophilie dans les cellules jeunes.
- Granulations* : Granulations très fines, et, très serrées, plus petites que celles des éléments neutrophiles. Elles ne se voient très bien qu'en coupes très minces (optimum $3,3 \mu$) et seulement à l'aide de l'objectif à immersion. A l'état frais et après adjonction de colorant, on ne remarque dans le cytoplasma des mégacaryocytes qu'une zone qui n'est pas tout à fait homogène, mais on n'y distingue jamais des granules nettement séparés. A l'état frais, cette zone granulaire est azurophile (Askanazy).
- Fonction* : Son rôle principal paraît être la fabrication des globulins.
- Rôle vicariant* : Le mégacaryocyte phagocyte, dans des conditions pathologiques seulement, dans les suppurations par exemple (Schridde), des cellules libres telles que leucocytes, érythrocytes, érythroblastes.
- Cytoplasma plus réfringent ; se voit très bien à l'état frais. Basophilie accentuée, presque constante.
- Souvent, on remarque dans le cytoplasma des ostéoclastes des granulations. Mais elles sont bien plus grosses que celles des mégacaryocytes. Ces granul. sont déjà visibles avec un fort grossissement sans l'aide de l'objectif à immersion. On les voit déjà très nettement, à l'état frais, sans adjonction de colorant.
- Résorption de la travée osseuse pendant l'ossification.
- L'ostéoclaste renferme plus rarement des cellules libres (inclusions).

Entre les mégacaryocytes et les polycaryocytes, il existerait des formes de passage (Foà) : une cellule peut contenir un gros noyau irrégulier et une série de petits noyaux. On a objecté à cette interprétation que les petits noyaux ont une autre signification : ils proviendraient de leucocytes englobés par des cellules à noyaux bourgeonnant (Branca). Si l'on considère tous les caractères différentiels indiqués par le tableau ci-dessus, il nous semble que le mégacaryocyte est nettement séparé de l'ostéoclaste, et, ces formes de passage bien analysées, se révèlent être les unes des ostéoclastes, les autres des mégacaryocytes.

Structure des mégacaryocytes.

Ce sont, à côté des ostéoclastes, les plus grosses cellules de notre organisme. Diamètre : 20-40 μ (Askanazy). Epaisseur 6-7 μ . En tout cas, ce sont les plus grandes parmi les cellules mononucléaires.

Protoplasma : Le cytoplasma des mégacaryocytes est très peu réfringent. Cet élément passe, le plus souvent, inaperçu en préparations fraîches. Depuis longtemps déjà, on a parlé de couches différentes dans ce cytoplasma. Heidenhain, décrivant la moelle osseuse du lapin, distingue plusieurs zones dans le corps cellulaire des cellules à noyau bourgeonnant : un endoplasma contenu dans le noyau et un exoplasma périnucléaire qui est en communication directe avec l'endoplasma par des brèches canaliculaires à travers la membrane du noyau. L'exoplasma, d'après cet auteur, est divisé en trois zones : une zone interne, c'est-à-dire une fine couche protoplasmique immédiatement autour du noyau et comprise en partie dans le noyau par les brèches canaliculaires. Cette zone interne est aussi appelée zone centrale. La zone externe ou marginale (Randsaum des auteurs allemands) est inconstante ; la zone moyenne décrite comme présentant de nombreuses granulations peut aussi faire complètement défaut. De ces trois zones, la plus constante est la zone interne que Denys et van der Stricht ont aussi constatée. La zone marginale a été décrite, pour la première fois, par Heidenhain. Après cette petite digression dans le domaine animal, nous nous hâtons de voir ce qui se passe chez l'homme. Tout l'exposé qui suit se rapporte à l'homme.

Granulations. Arnold, pour la première fois, en 1883, 1884, nous parle de granulations dans le cytoplasma des mégacaryocytes humains. D'après cet auteur, ce cytoplasma présente, à l'état frais, de fines granulations, mais bien visibles (!) ajoute-t-il. Nous dirons plutôt que nous ne voyons qu'un protoplasma qui n'est pas tout à fait homogène, et, que cet état n'apparaît qu'après adjonction de colorant et jamais à l'état frais sans autre. Ce cytoplasma, répétons-le, ne se caractérise que par une vague non homogénéité, et, nous insistons sur le fait qu'on ne distingue jamais *nettement* des granulations dans ce cytoplasma, à l'état frais. C'est seulement en coupes, que les granulations, comme nous le verrons, deviennent très visibles. Ce cytoplasma est peu réfringent. Un protoplasma dont les granulations sont bien visibles, à l'état frais, est en tout cas assez réfringent pour être vu, à l'aide de bons objectifs et sans adjonction de couleur, sur des préparations fraîches. Tel est le cas pour le polycaryocyte dont le cytoplasma et les granules sont bien réfringents par exemple, mais pas pour le mégacaryocyte dont les granulations et le cytoplasma en général sont si peu réfringents que, la plupart du temps, il passe inaperçu à l'état frais.

Arnold distingue ces granulations aussi bien dans l'endoplasma que dans la masse protoplasmique périnucléaire. En 1895, Arnold, par la méthode d'Altmann, trouve des granulations qui ont tendance à se grouper en champs. En 1896, ce même auteur, par une méthode de

coloration combinée (hématoxyline ferrique et le procédé d'Altman), a vu des figures bizarres dans le cytoplasma des mégacaryocytes, textuellement rapporté par Schridde : « rundliche, spindelförmige, verästigte und fädige Gebilde ». Ces figures font penser aux corps de Nissl des cellules ganglionnaires. Mais l'auteur ne nous dit rien de leur nature ! Cette constatation nous paraît avoir aucun rapport avec les vraies granulations très fines et serrées, mais ces figures nous semblent être plutôt fonction des fixateurs mis en œuvre.

Denys (1886-1888) parle par contre d'un protoplasma transparent et hyalin qu'il divise en endoplasma et exoplasma.

Schridde, en 1905 et 1907, examine des fragments de moelle osseuse fixés avec du formol et surtout le liquide d'Orth (formol-Müller), et, colorés par sa méthode : azur II éosine-acétone (cette méthode pour de plus amples renseignements est décrite, *in extenso*, dans Centralbl. für allg. Pathol. und pathol. Anatomie, 1905, Bd. XVI, H. 19). Sur des coupes ayant une épaisseur de 3-5 micra, l'auteur voit la cellule bourrée de granulations très serrées, de couleur rouge cramoisi. Ces granulations paraissent se rapprocher, dit-il, quant à la grandeur et à la teinte, des granulations neutrophiles des leucocytes.

Ces granulations ne se trouveraient, d'après Schridde, non seulement dans la masse protoplasmique périnucléaire, mais aussi dans l'endoplasma. Dans la plupart des cas ou au moins dans un grand nombre de cas, le corps cellulaire des mégacaryocytes est bourré de ces granulations. Dans un pourcentage assez grand, on voit une *zone marginale* (Randsaum ou äusseres Exoplasma de l'auteur) qui est toujours dépourvue de granules ; cette zone est hyaline, homogène. Elle se tranche toujours très nettement de la masse granuleuse. Le pourtour de cette *zone anhiste* est d'habitude irrégulier et présente des expansions protoplasmiques qui font croire que ces éléments sont doués de mouvements amoéboïdes (Askanazy, Wright).

Puisque H. Schridde a vu, le premier, *nettement*, ces granulations chez l'homme, nous en donnerons la description suivante tirée de sa publication : « Die Knochenmarks-Riesenzellen des Menschen » :

« Les préparations, je les ai faites avec de la moelle osseuse prélevée, chez des individus de tout âge, sur le fémur. Fixation avec la solution de formol ou, dans la plupart des cas, avec le mélange formaline-Müller. Les coupes ont été colorées en premier lieu par ma méthode : azur II, éosine-acétone ; puis d'après Altmann-Schridde. Enfin avec le vert de méthyle-pyronine (Pappenheim) ; avec le bleu polychrome de Unna ; avec le bleu de méthylène. » Schridde continue plus loin :

« La structure du protoplasma doit être décrite à l'aide de *coupes* colorées avec l'azur II, éosine-acétone, car c'est ainsi que les principaux caractères du protoplasma apparaissent de la façon la plus précise. Par cette méthode de coloration, se montre, dans le cytoplasma des mégacaryocytes, un grand nombre de granulations typiques, sur la déconverte desquelles j'ai déjà fait une communication, en décembre 1905 (Marburger naturwiss. Ges. Dez. 1905). Ces granulations, j'ai pu les constater sur toute moelle osseuse examinée depuis lors.

» Une partie des mégacaryocytes montre sur tout leur corps cellu-

laire, uniformément réparties, des *granulations très serrées*, de couleur rouge cramoisi et de grandeur, pour autant que l'on peut en juger, à peu près comme celles des leucocytes neutrophiles. Ces granulations sont *très distinctes*, et, sur des préparations bien réussies, très nettes. Elles se trouvent non seulement dans l'exoplasma, mais sont aussi réparties de la même manière dans l'endoplasma. Jamais on ne trouve une zone périnucléaire hyaline, aussi étroite que l'on voudra se l'imaginer.

» Alors que, dans un certain nombre de mégacaryocytes, tout le corps cellulaire se voit bourré de granulations, on trouve aussi un certain pourcentage de ces éléments qui présentent une *zone périphérique* (Randsaum) *homogène* sans granulations, d'une teinte pâle gris-bleuté. Cette zone hyaline est toujours nettement tranchée de la masse granuleuse. Très souvent cette *zone marginale* est irrégulièrement large et présente, par-ci par-là, des expansions protoplasmiques frangées.

» Le plus souvent on voit des cellules géantes de Bizzozero avec des granulations groupées en courtes lignes parallèles à la surface cellulaire. Ceci se rencontre tout aussi bien dans les coupes que sur des préparations faites par impression (Abklatschpräparate). Dans d'autres cellules géantes, apparaissent des bandes formées par un groupement de ces granulations. Et enfin, l'auteur constate d'une part des cellules géantes qui présentent des granulations concentriquement ordonnées autour du noyau et d'autre part des cellules avec des granulations disposées en champs plus ou moins larges et longs, et parallèles à la surface cellulaire. Entre ces champs de granulations, l'auteur voit des sentiers qui contiennent une substance qui possède les mêmes propriétés physiques et prend la même nuance que la zone marginale. C'est ainsi que ces sentiers apparaissent d'une teinte pâle, gris-bleuté. »

Enfin, l'auteur constate, dans des mégacaryocytes qui sont à un stade de développement plus avancé, des granulations qui sont si amassées qu'elles forment des blocs (Schollen). L'état granulaire de ces blocs n'est guère encore possible à voir, à l'aide du microscope. Ces blocs rappellent très bien, à première vue, les corps de Nissl des cellules ganglionnaires. Dans la même brochure, H. Schridde ajoute que dans les frottis (Abstrichpräparate) de moelle osseuse fixés par la chaleur et colorés pendant dix à quinze minutes, ces granulations apparaissent comme sur les coupes(!). L'auteur voit sur ces frottis : d'une part, la distribution uniforme des granulations dans certains mégacaryocytes ; d'autre part, des granulations qui sont concentriquement ordonnées autour du noyau, sous forme de lignes, bandes et champs ; et enfin, sur des frottis bien réussis, l'auteur remarque la zone marginale dépourvue de granulations.

Nous devons cependant relever un point qui nous paraît par trop exagéré. Nos nombreux frottis de moelle osseuse fixés soit par la chaleur, soit par l'alcool méthylique pur et anhydre, et nos nombreuses préparations fraîches, de même celles faites par impression (Abklatschpräparate de Schridde) nous ont jamais montré les granulations des mégacaryocytes d'une telle netteté. Nous n'avons remarqué, dans le protoplasma de ces cellules géantes, qu'une masse protoplasmique non tout

à fait homogène, mais nous n'avons jamais pu constater distinctement ces granulations, à l'aide de pareilles préparations. Sur des coupes très minces, comme nous le verrons, et seulement dans certaines conditions, on voit très nettement ces granulations.

Le noyau du mégacaryocyte. Ce qui est caractéristique pour cet élément, c'est le polymorphisme de son noyau bien étudié par J. Arnold. La plupart des cellules géantes de Bizzozero présentent un noyau arrondi, sphérique, ayant, en y mettant un peu d'imagination, des fenêtres ou brèches canaliculaires dans sa paroi ! D'autres cellules ont un noyau en boudin (Hoffmann et Langerhans). Bizzozero leur décrit un noyau bosselé, bourgeonnant. Certains histologistes parlent d'un noyau contourné en C, en croissant ou encore d'un noyau disposé en couronne, en anneau. Mais le noyau entier revêt, le plus souvent, la forme d'une sphère creuse. Parfois aussi, et nous l'avons constaté, le noyau est semblable à celui des leucocytes polynucléaires, mais de dimension plus considérable (Askanazy).

Sur nos préparations fraîches, faites par impression, ou sur nos frottis, nous avons remarqué plus rarement le noyau en couronne ou en anneau, ce qui est identique, mais le plus souvent un noyau sphérique. Ces préparations par opposition aux coupes minces nous montrent, en effet, toute l'épaisseur de la cellule, donc un noyau entier. La forme en couronne est particulièrement fréquente par contre, sur des coupes très minces ($3,3 \mu$) de moelle osseuse, moins fréquente sur des coupes de 5μ et plutôt rare sur celles de 6μ et plus. Ceci nous amènerait à croire que la forme en anneau ne serait produit que par une coupe à travers le noyau entier qui a la forme d'une sphère creuse. La sphère est l'image la plus commune, avons-nous dit, lorsque le mégacaryocyte, atteignant en moyenne 6-7 micra d'épaisseur, est intact. Les autres formes ne sont peut-être que des artifices produits au cours des manipulations que l'on fait subir aux préparations.

On nous objectera que ce noyau en couronne se rencontre aussi en préparations fraîches et sur des frottis. Nous le concédons ; mais, nous ajoutons : rarement sur de pareilles préparations, tandis que très fréquemment en coupes minces. De plus, nous pouvons émettre l'hypothèse jusqu'à preuve contraire : que la forme en couronne rencontrée sur des préparations fraîches et sur des frottis n'est qu'un noyau mutilé au cours des manipulations grossières des préparations autres que les coupes. Un noyau en forme de sphère creuse de si petite dimension nous paraît en effet très fragile, semble-t-il, et d'autant plus fragile qu'il est encore criblé de brèches canaliculaires.

Sur des préparations colorées, le noyau des jeunes mégacaryocytes est d'abord pâle, grand, rond ou en croissant. Plus tard, le noyau se déforme, peut devenir bourgeonnant, présenter même des fragments qui sont alors toujours réunis par des ponts de chromatine. A mesure que la cellule géante vieillit, son noyau devient de plus en plus pycnotique, plus foncé, parce que par contraction la chromatine est devenue plus compacte. Pour finir, le noyau apparaît si sombre que sa couleur seule suffit pour identifier l'élément (Askanazy).

DE LA NOTION DE MÉTACHROMASIE

Ehrlich, le premier, a parlé de *métachromasie*. Il nous en donne la définition suivante : la métachromasie est le fait qu'un colorant qui ne forme qu'un *seul* individu chimique est capable de colorer en nuances caractéristiques les différents éléments chromotropes tissulaires (Enzyklopädie der mikrosk. Technik, 1926, Bd. II, S. 1376-1380. Herausgegeben von R. Krause). Les matières colorantes capables de colorer en nuances caractéristiques sont appelées *métachromatiques* (Ehrlich), et, les éléments cellulaires ou tissulaires qui présentent cette particularité de prendre une nuance différente de celle du colorant employé, *chromotropes* (Ehrlich). Insistons que pour répondre exactement à cette définition (vraie métachromasie), il est nécessaire que le colorant utilisé soit un seul corps simple ou composé chimique nettement défini. Un mélange de couleurs ou la présence d'autres produits chimiques pouvant altérer en partie ou en totalité la constitution du colorant considéré comme métachromatique pour donner naissance à un colorant dérivé surajouté, ne nous autorisent plus de parler de métachromasie. S'il en était autrement, il n'existerait plus de différence entre la métachromasie et la double coloration (Doppelfärbung des auteurs allemands).

Si l'on s'en tient strictement à la définition donnée ci-dessus, il n'y a qu'un nombre restreint de colorants qui sont métachromatiques et qu'un nombre limité aussi d'éléments tissulaires qui prennent une nuance différente de la teinte de la matière colorante utilisée. Pour être plus concret, donnons quelques exemples :

Le fait que la substance amyloïde se colore en rouge-violet alors que les tissus normaux prennent une teinte verte avec le vert de méthyle (Jodgrün des auteurs allemands) ne doit pas être considéré comme une métachromasie. Nous savons, en effet, que cet excellent colorant pour la chromatine nucléaire contient toujours comme impureté du violet de méthyle, et c'est précisément ce dernier complexe qui teint en rouge-violet la substance amyloïde (L. Michaelis).

Autre exemple : le bleu polychrome de Unna est une préparation spéciale contenant toujours à côté du bleu de méthylène pur de l'azur de méthylène et, peut-être, encore d'autres colorants dérivés ayant pris naissance dans la solution. La substance amyloïde est colorée en violet, le mucus et les tissus cartilagineux en rouge avec ce complexe. Ce bleu polychrome est communément considéré comme très métachromatique. Ce n'est pas juste, toujours pour la même raison que nous avons de nouveau un colorant composé ne répondant plus du tout à la définition donnée par Ehrlich. Il s'agit ici aussi de double coloration et non pas de métachromasie.

Autre exemple : La safranine (chlorhydrate de tolosafranine) ou rose d'aniline possède de faibles propriétés métachromatiques vis-à-vis de la mucine qui, suivant la fixation, prend la nuance jaune ou violette.

Les noyaux sont colorés en rouge carmin. Le colorant étant de plus un seul individu chimique, est donc métachromatique vis-à-vis de la mucine. La mucine est chromotrope à l'égard de la safranine.

Autre exemple : L'iode colore le cytoplasma et les noyaux en jaune, la substance amyloïde en brun, les grains de glycogène en brun-acajou, et les grains d'amidon en bleu. Ce métalloïde est considéré comme métachromatique (L. Michaelis). C'est le plus ancien métachromatique que nous connaissons. On doit admettre, en effet, qu'il existe une différence de teinte entre ces quatre colorations de notre exemple : donc, l'iode répond à la définition donnée par Ehrlich. Nous avons, ici, à l'exception du cas de l'iode avec l'amidon, des métachromasies d'ordre physique, parce que nous croyons qu'entre une substance qui se teint en jaune, une autre en brun et une troisième en brun acajou avec l'iode, il n'y a qu'une plus ou moins grande affinité physique pour ce métalloïde. Ce phénomène est analogue à celui de trois teintures d'iode dont l'une, la plus concentrée, est brun acajou, la seconde plus diluée, brune, et enfin la troisième, la plus diluée, jaune.

Dans le cas de l'iode avec l'amidon, par contre, nous sommes en présence d'un phénomène plus complexe, d'ordre chimique. C'est une véritable combinaison chimique qui s'est passée entre ces deux corps. Dans cette réaction, l'iode a perdu ses propriétés d'iode élément, il est lié à l'amidon pour donner naissance à un composé nouveau ; tandis que, dans les cas de la substance amyloïde et des grains de glycogène, colorés avec la solution de Lugol par exemple, l'iode est tout simplement fixé sur ces corps organiques, mais pas combiné. Ces dernières substances organiques, fixant l'iode par simple adhésion ou adsorption comme le fait le charbon animal par exemple, se laissent arracher l'iode par de l'alcool, c'est-à-dire par un moyen physique.

Nous admettons, avec L. Michaelis, pour terminer cet exemple : que l'iode est métachromatique vis-à-vis de la substance amyloïde, des grains de glycogène et d'amidon, et, ces substances organiques sont chromatropes à l'égard de l'iode.

Autre exemple : *Le violet de méthyle* est aussi considéré comme métachromatique vis-à-vis des granulations des mastzellen et de la substance amyloïde qui sont teintées en rouge cerise, tandis que le protoplasma cellulaire se colore en violet. Or, nous savons que ce violet de méthyle est un mélange de chlorhydrates de tétra, penta et hexaméthylpararosaniline. Donc, de nouveau s'agit-il de colorations électives et non pas de métachromasie.

Parmi les colorants réputés métachromatiques, il faut citer les thiazines. Parmi celles-ci, seules le sont les matières colorantes *incomplètement* méthylées. Entre ces dernières, il faut énumérer la thionine et le bleu de toluidine. La sol. de thionine, préparée selon la formule de Maurice Nicolle (Thionine 0,5 ; alcool absolu 10 cc. ; ac. phénique cristallisée 8 gr. ; eau dist. jusqu'à 100 cm.) par exemple, colore la mucine en rouge. Cette sol. est bleue, et ne contient pas d'autre matière colorante, mais teint quand même la mucine en nuance différente du bleu. Donc, la thionine est métachromatique.

Par contre, une thiazine dont le groupe aminé est *complètement* méthylé (le bleu de méthylène par exemple) n'est plus métachromatique (L. Michaelis).

Parmi les substances colorantes utilisées en histologie, peu sont, comme nous le voyons, vraiment métachromatiques, et le petit tableau ci-dessous, emprunté en partie à L. Michaelis, nous résume toutes les vraies métachromasies admises à l'état actuel de nos connaissances :

<i>Matières colorantes.</i>	<i>Teinte norm. de la sol.</i>	<i>Subst. amylôide</i>	<i>Mastzel len</i>	<i>Mucine</i>	<i>Subst. fond. du cartilage</i>
-----------------------------	------------------------------------	----------------------------	------------------------	---------------	--------------------------------------

Sol. aq. de bleu de toluidine	bleue	rouge	rouge		rouge
Sol. aq. de thionine	bleue	bleue	rouge	rouge	rouge
Sol. aq. neutre d'azur de méthylène	bleue	violet	rouge	rouge	rouge
Sol. aq. de safranine	rouge-carmin			jaune ou violet	
Sol. de Lugol diluée	jaune	brun			
Sol. aq. de crésyl-violet R. R.	violette	bleue	rouge	rouge	rouge

<i>Matières colorantes (Suite).</i>	<i>Grains de glycogène</i>	<i>Grains d'amidon</i>	<i>Cellulose pure</i>
---	--------------------------------	----------------------------	---------------------------

Sol. aq. de thionine			bleu
Sol. aq. neutre d'azur de méthylène			lilas
Sol. aq. de safranine			rouge
Sol. de Lugol diluée	brun-acajou	bleu	jaune

Il est à remarquer que les métachromasies sont plus apparentes lorsque le colorant est en solution aqueuse convenablement diluée (optimum en sol. de $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{2}$ %). D'autre part, il est assez curieux de constater que la plupart des colorants métachromatiques sont bleus ou bleu-violet et basiques, et la nuance caractéristique tire sur le rouge.

DES MATIÈRES COLORANTES CONSIDÉRÉES COMME MÉTACHROMATIQUES VIS-A-VIS DES GRANULATIONS DU PROTOPLASMA DES MÉGACARYOCYTES.

Y A-T-IL MÉTACHROMASIE, OUI OU NON ?

Monsieur le professeur Askanazy, le premier, a remarqué que le cytoplasma des mégacaryocytes, prend, à l'état frais et après adjonction de solutions de bleu de méthylène, une teinte lilas à l'exclusion des autres éléments de la moelle osseuse qui sont franchement colorés en bleu. Après cette observation pleine d'intérêt, le Dr H. C. Frey nous décrit, en supplément de son beau travail intitulé : « Das Verhalten der Megakaryozyten im menschlichen Knochenmark und deren Beziehungen zum Gesamtorganismus », d'autres colorations utilisables pour faire ressortir, en préparations fraîches, le protoplasma de ces cellules géantes, colorations que l'auteur croit être métachromatiques. Toutes ces colorations spéciales qui, à première vue semblent être métachromatiques et nous facilitent d'analyser les caractères du protoplasma des mégacaryocytes sont intéressantes, mais il importe de connaître la nature de ces nuances caractéristiques. Nous reprenons maintenant ces mêmes matières colorantes et, après analyse de chacune d'elles, nous verrons s'il y a métachromasie au sens de Ehrlich ou tout simplement double coloration (Doppelfärbung) ?

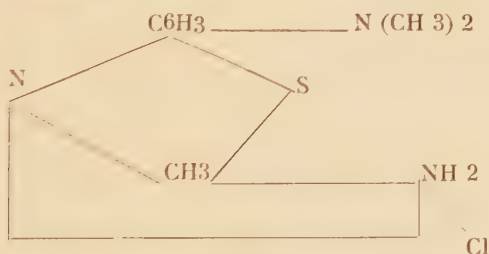
I. Le bleu de méthylène et l'azur de méthylène.

Le bleu de méthylène est une thiazine complètement méthylée (un sel chloruré de la tétraméthyl-thionine). Nous avons vu dans le chapitre précédent qu'une thiazine complètement méthylée n'est pas métachromatique. Dans le commerce, le bleu de méthylène nous arrive sous deux formes différentes : le chlorhydrate de tétraméthyl-thionine et le chlorure double (chlorhydrate de tétraméthyl-thionine associé au chlorure de zinc). Ces deux sels sont très solubles dans l'eau et l'alcool, et peuvent l'un ou l'autre être utilisés dans la technique microscopique. Les deux aussi sont susceptibles de donner des produits de décomposition qui interviennent lors de la coloration des préparations microscopiques.

D'après les recherches du professeur Bernthsen, nous connaissons deux matières colorantes, produits de décomposition du bleu de méthylène med. purissimum, desquelles il faut tenir compte dans l'interprétation des phénomènes de coloration. Ces deux produits ont reçu par ce chimiste qui, le premier, les a analysés les noms de violet de méthylène et d'azur de méthylène ; mais leurs formules de constitution n'ont pas été établies d'une façon définitive par cet auteur. Depuis que l'on colore, en histologie, avec certaines préparations de bleu de méthylène (bleu de Löffler, bleu polychrome de Unna, azur II. de Grübler, bleu

Borel), on a constaté que certains éléments se teignent en rouge-violet, lilas, d'autres en rouge, colorations surtout bien visibles à la lumière de la lampe.

Ces nuances spéciales que confèrent certaines solutions de bleu de méthylène ont été prises pour des métachromasies par beaucoup d'auteurs. C'était juste à l'époque où l'on ignorait la vraie nature de l'azur de méthylène, mais de nos jours, on doit faire justice de cette erreur. L'azur de méthylène, en effet, dont la formule de constitution nous a été donnée par le professeur Kehrmann, de Lausanne, et, qui était déjà considéré comme un autre corps que le bleu de méthylène par Bernthsen, est maintenant chimiquement défini. Cet azur (Methylenazur de Bernthsen) prend naissance dans les solutions *alcalines* de bleu de méthylène, et contient d'après Kehrmann deux groupes méthyl- (-CH₃) en moins que le bleu dont il dérive. *Cet azur est un chlorure de la diméthyl-thionine* dont la formule de constitution donnée par ce dernier chimiste est la suivante :



L'azur de méthylène est une matière colorante des plus bizarres par ses diverses teintes qu'elle donne aux différents milieux où elle se trouve. La couleur de sa solution change non seulement suivant la réaction du milieu, mais aussi suivant les solvants de même réaction de cette matière colorante. C'est donc un corps extrêmement labile. Exemple : le chlorhydrate d'azur de méthylène pur (Azur I. de Grüber) donne une solution bleu dans l'eau dist. neutre ou dans l'alcool neutre. Dans de l'eau dist., alcalinisée préalablement, sa solution est rouge-violacée (lilas). En milieu légèrement acide, la sol. de méthylène vire au bleu. Le bleu de méthylène med. puriss. est insoluble dans l'éther, le xylol, et, colore toujours en bleu ses solvants (eau, alcool éthylique ou méthylique, chloroforme), de plus, ne change pas de teinte en milieu acide. L'azur de méthylène, par contre, est soluble dans l'eau, l'alcool, l'éther, le chloroforme, le xylol, et, ces différentes solutions ont des teintes variables. Dans l'eau dist. neutre ou l'alcool neutre, comme nous venons de le dire, sa solution est bleue ; dans l'éther, elle est rouge ; dans le xylol, rouge rubis ; dans le chloroforme, violette. C'est cette labilité de teinte de l'azur de méthylène qui explique pourquoi cette matière colorante ne colore souvent pas les mêmes éléments d'une façon constante, mais différemment suivant les manipulations qu'on fait subir aux éléments tissulaires que l'on cherche à colorer. Exemple : la solu-

tion de bleu de méthylène-Löffler colore, par son azur de méthylène, le protoplasma frais des mégacaryocytes en lilas, mais si l'on colore avec cette même solution une coupe de moelle osseuse provenant pourtant de la même nécropsie, le cytoplasma des mégacaryocytes comme le protoplasma basophile des autres éléments médullaires se présente toujours en bleu. Jamais, dans nos expériences, une nuance caractéristique n'a été observée sur les coupes colorées avec le bleu de Löffler.

Expériences personnelles.

1. Si l'on prépare une solution de bleu de méthylène médicinal avec une eau bi-distillée neutre (*solution 1*), et, si on la conserve dans un flacon de verre *non alcalin*, bien bouché à l'émeri, on peut garder une pareille solution pendant des mois (nous en avons une depuis bientôt une année), sans qu'elle présente des traces d'azur de méthylène. Avec une pareille solution, jamais nous n'avons obtenu une nuance caractéristique après coloration, soit des préparations fraîches de moelle osseuse, soit de coupes du tissu médullaire, mais tous les éléments basophiles se teignent franchement en bleu plus ou moins foncé. Donc, toute solution de bleu de méthylène n'est pas propre, comme d'aucuns pensent, à donner une nuance spéciale autre que le bleu.

2. Si, par contre, on conserve une pareille solution dans un flacon de verre alcalin, de neutre qu'elle était au début elle deviendra légèrement alcaline, et présentera, au bout de quelques semaines ou mois, de l'azur de méthylène en traces (*solution 2*) qui suffiront pour produire une nuance caractéristique. C'est ainsi que la plupart des éléments histologiques sont teints avec cette solution 2, en bleu par le bleu de méthylène inattaqué, et, d'autres éléments plus rares (le protoplasma frais des mégacaryocytes par exemple) en lilas par l'azur de méthylène. Cette dernière constatation a fait croire que toute vieille solution de bleu de méthylène est susceptible de colorer en rouge-violacé, lilas, certains éléments microscopiques. Ce n'est pas exact, car il faut que la solution de bleu de méthylène s'alcalinise, soit aux dépens du verre du récipient, soit aux dépens d'une base qu'on ajoute à la solution, pour que l'azur de méthylène indispensable à la production de la nuance caractéristique y prenne naissance.

3. Une solution de bleu de méthylène qui contient des traces d'alcali (1 ‰ et même moins 1/10000 de KOH par exemple, comme dans la solution de Löffler qui contient à peu près cette dernière quantité) présentera, au bout de quelques heures déjà, de l'azur de méthylène (*solution 3*). Si l'on alcalinise une solution de bleu de méthylène plus fortement (0,5 ‰ de KOH par exemple), on obtiendra instantanément cet azur. Insistons sur le fait que la potasse caustique peut être remplacée par la soude caustique ou une autre base. Ce qui importe dans la formation de cet azur, c'est que la solution de bleu de méthylène soit alcaline, et, suivant le degré d'alcalinité de la solution, qu'on lui laisse le temps de mûrir.

In vitro, nos expériences ont confirmé nos dires. Nous savons que le bleu de méthylène pur est insoluble dans l'éther, le xylol, tandis que l'azur de méthylène y est soluble. Si, dans un godet en porcelaine nous mêlons quelques gouttes de la solution 1 avec quelques cm³ de xylol (ou d'éther) nous remarquons, même après avoir bien mélangé le tout au moyen d'une baguette de verre, qu'il ne se produit aucune diffusion de couleur dans le xylol. Après un instant, la solution 1 se ramasse en boule au fond du godet, le xylol surnage et reste incolore et transparent comme l'eau de roche, aussi bien après qu'avant l'expérience. Donc, l'azur de méthylène, n'a pas pris naissance dans la solution 1, qui est pourtant vieille d'à peu près une année. Si, dans un second godet, contenant du xylol ou de l'éther, nous mettons maintenant quelques gouttes de la solution 3, nous constatons même sans mélanger ces liquides, une diffusion de couleur rouge rubis dans le xylol ou l'éther. La sol. aqueuse de bleu de méthylène restera au fond du godet ; le xylol ou l'éther contenant en dissolution l'azur de méthylène surnage. Voilà une seconde preuve évidente que l'azur de méthylène a pris naissance dans la sol. 3. Les solutions de bleu de méthylène (sol. de Löffler, le bleu polychrome de Unna, le bleu Borel, etc.) considérées comme métachromatiques, contiennent toutes de l'azur de méthylène dérivé du bleu de méthylène dans des conditions convenables.

D'après cet exposé, nous voyons que tous ces bleus ne sont que des *colorants composés*, au même titre l'azur II de Giemsa (mélange de chlorhydrate d'azur de méthylène ou azur I et de chlorhydrate de bleu de méthylène) qui lui figure pourtant sous la rubrique des « colorants composés ».

Il serait donc plus juste de dire que ces bleus sont *polychromatiques* et non pas métachromatiques.

Polychromasie n'a pas la même signification que métachromasie. Nous avons vu que la métachromasie implique l'idée d'un *seul colorant* constitué par un seul individu chimique. La polychromasie, par contre, est le fait qu'un *colorant composé* (le Giemsa, le bleu polychrome de Unna par exemple) est capable de colorer en diverses couleurs les différents éléments cellulaires ou tissulaires (ces diverses teintes préexistent déjà dans la solution utilisée).

Pour nous, il n'y a plus de doute que de pareilles solutions de bleu de méthylène ne présentent qu'un phénomène courant de *double coloration* à l'instar des colorants composés plutôt qu'une métachromasie.

Nous donnons, à titre de renseignements, la composition des différentes solutions de bleu de méthylène auxquelles nous avons fait allusion dans cet article.

a) Composition de la solution de bleu de méthylène selon Löffler :

Sol. alcool. saturée de bleu de méthylène médicinal 30,0 ccm. ;

Sol. aq. de potasse caustique (0,01 %) ad 100,0 ccm.

b) Composition du bleu de Unna :

Bleu de méthylène médicinal	1,0 gr.
Carbonate de potasse	1,0 gr.
Alcool éthylique	20 ccm.
Eau distillée ad	120 ccm.
Evaporer au bain-marie jusqu'à	100 ccm.

c) Préparation du bleu Borel :

Dans une fiole de contenance de 150 ccm. environ, on met 3 gr. de cristaux de nitrate d'argent et 50 à 60 ccm. d'eau distillée. Quand ces cristaux sont dissous, on remplit la fiole avec une solution de carbonate de soude à 10 % et on agite. Il se forme un précipité d'oxyde d'argent qu'on filtre et lave à plusieurs reprises à l'H₂O dist., jusqu'à ce que le filtrat ne bleuisse plus le papier de tournesol. L'oxyde d'argent ainsi lavé est mis dans une seconde fiole et on verse alors, sur cet oxyde, une sol. aq. à 1 % de bleu de méthylène médicinal. Le bleu de méthylène subit ainsi en partie une transformation profonde de façon que le mélange final est composé de trois colorants : le bleu de méthylène inattaqué, l'azur de méthylène bien connu à l'heure actuelle et le violet de méthylène moins connu.

Avant que ce mélange soit prêt à être utilisé, il faut en tout cas attendre trois semaines pour que la solution ait le temps de mûrir. Il faut l'agiter à plusieurs reprises, puis on filtre. La solution de bleu Borel est prête. Si l'on est pressé, on mûrit immédiatement la solution en la chauffant pendant 45 minutes, à 120°, à l'autoclave.

d) Composition de l'azur II de la maison Grübler :

C'est un mélange, à parties égales, de chlorhydrate d'azur de méthylène (azur I) et de chlorhydrate de bleu de méthylène.

II. La pyronine.

La pyronine est un colorant basique d'aniline qui teint intensivement en rouge les éléments basophiles. Elle est insoluble dans l'éther, peu dans le chloroforme et l'alcool, très soluble dans l'eau distillée. La solution aqueuse neutre est rouge et présente une nette *fluorescence* jaune surtout bien visible lorsque la concentration du colorant est faible. La solution de pyronine vire à l'orange avec l'ac. chlorhydrique. La soude caustique y produit un fin précipité rouge carmin. D'après Mayer, la pyronine du commerce contient comme impureté du *jaune d'acridine* et en outre beaucoup de dextrine. C'est à cause de la présence de ce dernier corps qu'une vieille solution de pyronine montre, au microscope, des moisissures. Pour éviter une culture de champignons, il suffit d'ajouter à la solution de pyronine fraîchement préparée 2 % de formaline ou bien, à mesure de son emploi, faire une solution extemporanée.

En solution aqueuse très diluée (1 ‰ par exemple), la pyronine présente nettement du *dichroïsme*. Une pareille solution est rouge par réfraction et jaune-rougeâtre, rouge brique, par réflexion. Ce dichroïsme est dû à la présence du jaune d'acridine. Ce corps, qui entre dans la composition d'une préparation beaucoup utilisée, ces dernières années, en dermatologie, sous les désignations de trypaflavine et de gonacrine, peut être partiellement extrait de la solution aqueuse de pyronine au moyen d'éther, si l'on a soin d'agiter vigoureusement le mélange. Cet extrait éthéré présente aussi du dichroïsme : par réfraction il paraît jaune, et par réflexion jaune-verdâtre, légèrement opalescent. Le dichroïsme de la solution de pyronine varie en intensité suivant l'épaisseur du liquide et est aussi fonction de la concentration de la solution : il est proportionnel à la dilution du liquide. En concentration de 1 ‰ par exemple et sous une épaisseur de 2 cm. on ne retrouve plus cette propriété, à l'œil nu. Si l'on prépare une solution de pyronine de 1 ‰, le dichroïsme est très apparent.

La solution aqueuse de pyronine a été considérée comme métachromatique vis-à-vis du cytoplasma des mégacaryocytes. H. Frey, dans son travail (*das Verhalten der Megacaryozyten im menschlichen Knochenmark u. deren Beziehung zum Gesamtorganismus*, Frankfurter Zeitschrift, Bd. 36) nous dit : qu'avec une solution aqueuse (1/2-1 ‰) de pyronine ou une sol. faiblement basique de pyronine, le protoplasma à l'état frais des mégacaryocytes montre une coloration rouge brique (Ziegelrot). Mais comme nous venons de le voir, cette nuance spéciale préexiste dans la solution aqueuse de pyronine. Cette teinte caractéristique est tout simplement due à la présence du jaune d'acridine. Donc, avec cette matière colorante, nous avons de nouveau une polychromasie, une double coloration, et non pas, une métachromasie dans le sens que Ehrlich lui a donné.

III. La vésuvine.

La vésuvine ou brun de Bismarck (Bismarckbraun des auteurs allemands) est un colorant basique d'aniline qui colore en brun comme son nom l'indique les éléments basophiles. Il doit être dissous à chaud ; on filtre après refroidissement. Il s'emploie en sol. aq. à 1 ‰ surtout pour teindre les noyaux, les cartilages, la mucine et les microbes. On différencie par l'alcool absolu. Par différencier, on entend éliminer l'excès de colorant qui n'est pas fixé sur les éléments électifs. Ce colorant est surtout employé pour les doubles colorations. H. Frey nous dit, dans son travail, qu'une solution aqueuse de brun de Bismarck (1/2-1 ‰), neutre, colore le protoplasma des mégacaryocytes en préparations fraîches d'une nuance jaune canari. Cette teinte que l'auteur prétend avoir vue sur ces éléments, mais que nous voyons sur la cellule adipeuse seulement, dépend tout simplement d'une impureté surajoutée. L'expérience suivante nous en donne la preuve. La vésuvine est insoluble dans l'éther, le chloroforme et le xylol. Si nous préparons

une sol. aq. neutre de vésuvine, $\frac{1}{2}$ 1⁰₀, et, si nous la mettons en présence d'un peu d'éther, après avoir bien agité le mélange, nous remarquons qu'une impureté, enfermée dans la vésuvine pendant sa cristallisation et solubilisée maintenant dans l'eau, passe dans l'éther. Cette impureté est précisément de couleur jaune canari. Après plusieurs lavages à l'éther, on arrive à débarrasser presque complètement la vésuvine de cette substance étrangère. Si nous colorons avec une sol. de vésuvine, préalablement purifiée comme nous venons de l'indiquer, de la moelle osseuse fraîche, la cellule adipeuse, incolore en préparation fraîche, reste incolore et claire comme si l'on n'y avait pas ajouté de colorant. Tandis qu'une sol. aq. neutre de vésuvine du commerce donne une nuance jaune canari, mais seulement aux cellules grassieuses, incolores à l'état frais.

IV. Le violet cristallisé.

Le violet cristallisé (Krystallviolett des auteurs allemands) est aussi un colorant basique d'aniline. C'est le chlorhydrate d'hexaméthylpararosaniline. D'après Mayer, ce violet cristallisé contiendrait 8⁰₀ de sulfate de soude. Il est très soluble dans l'eau et l'alcool, et, colore, comme il était à le prévoir, les éléments anatomiques basophiles en violet.

H. Frey, dans son étude sur les mégacaryocytes, dit que ce colorant, en sol. aq. neutre ($\frac{1}{2}$ 0⁰₀), teinte le cytoplasma des mégacaryocytes en un ton violet clair. L'auteur classe cette coloration dans la catégorie des colorants métachromatiques. Nous disons tout de suite que c'est se méprendre, pour la seule raison que le violet clair ne diffère du violet foncé que par une différence d'intensité dans la même teinte, et non pas par une autre nuance. Or, seule la nuance différente nous autorise d'admettre une métachromasie. Pour nous, donc, il n'y a qu'une simple coloration semblable à celle que l'on obtient avec les colorants simples habituels, avec lesquels, certains éléments sont aussi plus ou moins colorés, mais toujours dans le même ton.

Nous faisons cependant remarquer que nous savons que le violet cristallisé utilisé comme indicateur peut, à part du violet, nous donner d'autres nuances : du bleu, du bleu-vert, du vert, même du jaune or, suivant la concentration en ions H^+ de la solution de violet cristallisé. Si, par exemple, la concentration ionique du milieu est de $H^+ 10N$ (10 fois normale), la sol. de violet cristallisé est d'un jaune d'or ; si la concentration en ions H^+ de cette solution est de $pH = 0$ (c'est-à-dire une sol. de violet crist. dans un acide de conc. normale), la sol. de violet crist. sera verte ; si la conc. en ions H^+ est de $pH = 1$ (c'est-à-dire une sol. de violet crist. dans un acide $N/10$), le violet crist. nous donnera une sol. d'un bleu-vert ; si la conc. en ions H^+ est de $pH = 2$ (c'est-à-dire une sol. de violet crist. dans un acide $N/100$), la sol. de violet cristallisé est bleue ; et enfin, si la conc. ionique de sa solution n'est que de $pH = 3$ (c'est-à-dire une sol. de violet crist. dans un acide très dilué $N/1000$), la solution de violet cristallisé est

violette. Si la sol. de violet est neutre ($\text{pH} = 7$) elle est violette. Si la sol. est très faiblement alcaline ($\text{pH} = 8$, c'est-à-dire dans une sol. N. 1000000 de base), elle restera violette ; de même, une sol. de violet crist. de $\text{pH} = 12$ (c'est-à-dire une sol. contenant N/100 d'alcali) sera toujours violette. Mais ces considérations n'ont rien de commun avec la notion de métachromasie qui nous occupe.

V. La safranine.

La safranine (Safranin extra S, Berlin) est aussi un colorant basique d'aniline. Peu soluble dans l'eau (0,6 %), très soluble dans l'alcool. Comme on le fait parfois, il est avantageux de conserver la safranine en milieu alcoolique saturée et de diluer à volonté quelques gouttes de cette solution dans l'eau saturée d'aniline et filtrée (l'aniline est soluble à 3 % dans l'eau), au moment de s'en servir. On différencie avec l'alcool à 95° ou avec l'alcool-acide (0,5 % d'HCl).

Sachant que la safranine possède des propriétés métachromatiques vis-à-vis de la mucine qui, suivant la fixation, prend la nuance jaune ou même violette, et, que M. le professeur Askanazy a décrit, dans un cas d'hypernéphrome, des cellules épithéliales dont le protoplasma s'était coloré en jaune orange avec cette couleur alors que le noyau avait pris la teinte rouge (Beiträge z. pathol. Anatomie, Bd. XIV, 1893), nous avons essayé de voir ce qu'il advient lorsque nous mettons une sol. de safranine en contact du cytoplasma des mégacaryocytes à l'état frais. Ce que nous pouvons dire : c'est que la safranine, excellent colorant nucléaire et colorant de la mucine (Flemming), n'est pas du tout métachromatique à l'égard du cytoplasma des mégacaryocytes, ni envers les autres éléments de la moelle osseuse.

DE L'EXAMEN DES MÉGACARYOCYTES EN PRÉPARATIONS FRAICHES ET SUR DES FROTTIS DE MOELLE OSSEUSE

La moelle osseuse qui a fait l'objet de nos examens à l'état frais, a été prise sur des côtes et le tiers supérieur du fémur : quelquefois aussi, à l'occasion, sur le tibia de nouveau-né. Avant de colorer, nous avons chaque fois examiné la moelle osseuse à l'état frais.

Préparations fraîches.

Sur une lame, nous avons déposé deux gouttes d'une solution isotonique au plasma sanguin (sol. de Ringer) ou tout simplement d'une solution physiologique ordinaire (9 ‰ de NaCl). Dans ce liquide, nous avons mis une parcelle de moelle osseuse fraîchement prélevée et, pas plus grosse qu'une demi-tête d'épingle. Le tout a été recouvert d'une lamelle, sur le dos de laquelle, on a exercé délicatement une pression avec la pulpe de l'index droit, pour mieux étaler le tissu médullaire. Nous avons examiné au microscope avec un grossissement faible, puis fort, en ayant le diaphragme iris rétréci et, constaté, comme d'ailleurs tous ceux qui se sont occupés de préparations fraîches de moelle osseuse, combien le cytoplasma des mégacaryocytes est peu réfringent que, la plupart du temps, ces éléments passent inaperçus. Le noyau même de ces cellules peut rester invisible.

Les préparations fraîches, faites *par impression*, nous ont donné à peu près les mêmes résultats négatifs avec cette différence cependant que ce genre de préparations nous a montré des éléments sous une couche plus mince. Cette méthode se pratique de la façon suivante : avec un fragment de moelle osseuse provenant d'un fémur, on touche légèrement la surface d'un porte-objet. Immédiatement, sans attendre que la préparation soit sèche, on ajoute deux gouttes de solution physiologique. On recouvre l'ensemble d'une lamelle et examine au microscope toujours avec un éclairage modéré comme pour tous les examens à l'état frais. Nous avons été chaque fois frappé de la faible réfringence du cytoplasma des mégacaryocytes.

Nous avons aussi essayé de faire des préparations fraîches par le procédé de la *touche* (Tupfen des auteurs allemands), méthode qui se pratique de la manière suivante : avec une baguette de verre dont une extrémité est arrondie, on prélève de la moelle osseuse provenant d'un os spongieux (côte, corps vertébral). Avec l'extrémité chargée de moelle, on touche successivement une série de 8 à 10 porte-objets sans recharger la baguette de moelle. On obtient ainsi des préparations avec des couches de moelle osseuse de plus en plus minces à mesure que l'on avance dans la série. Sans leur donner le temps de sécher, on leur ajoute du sérum physiologique. Même résultat que précédemment.

Après ces examens à l'état frais, nous avons ajouté à de semblables préparations, au lieu de la solution physiologique, des solutions de matières colorantes dont nous avons parlé.

Si, aux préparations fraîches, comme le professeur Askanazy l'a démontré pour la première fois, il y a des années, on ajoute une sol. de bleu de méthylène Löffler (1 : 4 p. H₂O dist. optimum), on voit que le protoplasma des mégacaryocytes prend une teinte lilas, alors que toute la préparation se colore en bleu. Pour l'obtention de cette nuance caractéristique, le professeur Askanazy préconise la méthode suivante : sur une lame, on dépose deux gouttes d'une solution de Löffler (1:4 p. d'eau dist.). Dans cette couleur, on met une parcelle de moelle osseuse de la grandeur d'une tête d'épingle, provenant par expression d'une côte. On recouvre le tout d'une lamelle. On exerce une faible pression sur cette dernière pour mieux étaler le tissu médullaire et faciliter ainsi l'examen. Pendant tout le temps de la coloration, on examine au microscope à l'aide d'un faible, puis d'un fort grossissement, en faisant constamment jouer la vis micrométrique. On remarque que le cytoplasma des cellules géantes de Bizzozero se colore insensiblement en lilas, et, que lui seul prend cette nuance spéciale, alors que tous les autres éléments ainsi que le noyau des mégacaryocytes sont colorés en bleu. Pour éviter les bulles d'air, avant de couvrir l'objet avec la lamelle, on dépose, sur sa face inférieure, une petite goutte de la sol. colorante correspondante.

Le professeur Askanazy procède encore de la façon suivante. Il prend un porte-objet, y dépose un petit fragment de moelle osseuse, recouvre l'objet d'une lamelle et ajoute ensuite le colorant au bord de celle-ci. Le liquide pénètre ainsi par capillarité et commence à colorer la préparation fraîche par sa périphérie. De cette manière, on peut suivre la coloration par étapes. Le protoplasma des cellules géantes en question est nettement lilas et le noyau de ces éléments d'un bleu pâle. De plus, par ce second procédé, on constate que le cytoplasma des mégacaryocytes se teinte bien avant les autres éléments de la moelle osseuse.

Si, maintenant, à l'exemple du docteur H. Frey, nous ajoutons aux préparations fraîches, une solution neutre ou faiblement alcaline de pyronine ($\frac{1}{2}$ -1%), nous obtenons, comme du reste le D^r H. Frey l'a déjà signalé, une coloration rouge-brique du cytoplasma des cellules géantes de Bizzozero. Les autres éléments basophiles se teignent en rouge. Si, pour terminer cette série de colorations, nous colorons avec une sol. de vésuvine ($\frac{1}{2}$ %) et, en nous mettant dans les mêmes conditions indiquées par le D^r H. Frey, nous pouvons affirmer en toute certitude que jamais nous avons vu le cytoplasma des mégacaryocytes prendre la nuance jaune-canari. C'est seulement la cellule adipeuse qui prend cette teinte spéciale, alors que tout le reste du champ microscopique, les cellules géantes y comprises, se colorent en brun.

Les frottis.

Le frottis est un bon moyen d'examen en microbiologie, moins recommandable en histologie (exception faite cependant en hématologie), surtout lorsqu'il s'agit d'étudier la fine structure cellulaire de grosses cellules telles que les mégacaryocytes. Le plus souvent, en effet, on abîme, par ce procédé, les gros éléments. Si l'on désire quand même faire des frottis de moelle osseuse, il est indiqué d'étaler celle-ci, non pas avec une lame de verre simple ou rodée comme on le fait couramment en bactériologie pour examiner du pus, mais avec un morceau de carton mince pour ne pas exercer une pression par trop brutale néfaste aux éléments. Le carton à l'usage des frottis doit être coupé franc aux ciseaux sur le côté qui doit servir à l'étalement et celui-ci se fait d'une seule fois sur la moitié de la surface de la lame.

Sur des porte-objets nous avons déposé une parcelle de moelle osseuse, mieux encore, chargé un morceau de carton avec la moelle osseuse provenant par expression d'un os spongieux (côte, sternum), et l'avons étalé sur des lames. Nous avons séché nos frottis par agitation à l'air. Puis, nous les avons fixés en les laissant séjourner 5-10 minutes dans de l'alcool méthylique pur et anhydre. Certains de nos frottis ont été fixés par la chaleur, mais la manœuvre en est délicate. On les passe pour cela lentement comme si l'on coupait du pain, à trois reprises, dans la partie chaude d'une flamme d'un bec Bunsen, le frottis en dessus bien entendu. Mais il est plus recommandable, pour éviter de trop chauffer, d'employer la platine chauffante à défaut d'une étuve à dessiccation à air chaud. La méthode de fixation des frottis sur la platine chauffante est rapide et très simple. La platine

chauffante en cuivre étamée en forme de  est chauffée à son extrémité libre au moyen d'un bec Bunsen. On attend que la plaque ait pris une température constante. Sur les parties très chaudes (140° C. environ) de la plaque, une goutte d'eau roule immédiatement sur celle-ci (phénomène de Leidenfrost) ; sur les endroits moins chauds, une goutte d'eau s'évapore rapidement en produisant un sifflement semblable à celui d'un fer rouge que l'on plonge dans l'eau. On cherche par tâtonnement l'endroit de la plaque où la goutte d'eau roule juste encore sans se vaporiser rapidement. C'est là que l'on déposera la préparation à fixer. On attend 10-15 secondes pour des lames de verre minces. La fixation est alors terminée. Nous sommes arrivés à la coloration de nos frottis.

a) Avec une sol. de *bleu de méthylène* médicinal pure (solution 1) ou même une sol. de bleu Löffler ($1/4-1/2-1\%$), tous nos frottis se sont colorés en bleu. Les mégacaryocytes dont le protoplasma, à l'état frais, montre toujours une nuance lilas avec la sol. de bleu Löffler, ne prennent plus cette nuance caractéristique en frottis.

b) D'autres frottis colorés avec des sol. aqueuses neutres ou faible-

ment basiques (0,1 ‰ de KOH) de *pyronine* en concentration variant de $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{2}$ -1 ‰. Résultats : tous les éléments basophiles sont rouges. Nous n'avons plus retrouvé la teinte rouge-brique décrite au cytoplasma des mégacaryocytes.

c) D'autres frottis de moelle osseuse ont été colorés avec des sol. neutres de *vésuvine* de concentration variable ($\frac{1}{4}$ -1 ‰). Résultats : Tous les éléments basophiles sont en brun. Pas de nuance spéciale jaune-canari dans le cytoplasma des mégacaryocytes.

d) D'autres frottis enfin ont été colorés avec le *violet cristallisé* en sol. aq. neutre ($\frac{1}{2}$ ‰). Résultats : les éléments basophiles prennent une coloration violette. Pas de nuance caractéristique, non plus dans le cytoplasma des cellules géantes en question.

DE LA COLORATION DES MÉGACARYOCYTES EN COUPE

Avant d'arriver à la coloration des coupes, nous allons exposer comment les fixations et inclusions des fragments de moelle osseuse destinés à fournir nos préparations ont été faites.

A. Préparation de la moelle osseuse avant la fixation.

Nous avons prélevé la moelle osseuse sur le fémur humain, au niveau du tiers supérieur de cet os. Il y a deux avantages à choisir cet endroit. D'abord, nous avons rarement le désagrément de rencontrer des trabécules osseuses à ce niveau, trabécules qui nous obligeraient de décalcifier (manœuvre néfaste à la structure cellulaire) la moelle osseuse avant de l'inclure. Puis, c'est à cette place que l'on a presque toujours l'occasion de rencontrer de la moelle rouge. Après avoir enlevé, au moyen d'un ciseau, la partie ant. de cet os long jusqu'au canal médullaire, nous avons sorti minutieusement avec un scalpel un cylindre de moelle rouge d'une longueur de quelques cm. Ce tissu médullaire nous l'avons posé sur un papier filtre, puis coupé en fragments de 3-5 mm. d'épaisseur, à l'aide d'un *rasoir*, jamais aux ciseaux ou au scalpel. Il ne faut pas se servir, nous insistons sur ce point, d'un simple bistouri, même s'il est fraîchement aiguisé, parce qu'on écrase toujours ce tissu mou. N'oublions pas que les nerfs et gros vaisseaux se trouvent au centre de la moelle osseuse et qu'ils se coupent assez mal au scalpel, vu qu'il n'y a pas de résistance immédiatement sous eux. En l'utilisant quand même, on risquerait de déplacer les éléments médullaires et de ne plus reconnaître les rapports anatomiques existant entre ces éléments. Il est même recommandable, avant de couper le cylindre de moelle au rasoir, de durcir le morceau prélevé avec le liquide fixateur qu'on désire employer. Les organes prélevés y demeurent quelques heures. Ils prennent ainsi une consistance suffisante pour ne pas être écrasés pendant la coupe au rasoir. Ce détail n'est pas absolument nécessaire, mais il est bon de l'observer si l'on a affaire à des tissus très mous.

Au bout de trois heures, pour une épaisseur de 10 mm., le cylindre de moelle a pris une consistance assez ferme pour être coupé en fragments de 5 mm. de long.

B. Fixations.

Ces fragments de moelle osseuse sont alors immédiatement portés dans un liquide fixateur, et, ceci, pour empêcher l'autolyse ainsi que la putréfaction. Ces fixateurs durcissent en même temps plus ou moins bien les organes. Comme liquides fixateurs, nous sommes servis des suivants :

1. *Le mélange d'Orth* : que l'on prépare au moment de l'emploi :

Liquide de Müller	20 ccm.
Formaline (4 %) ad	100 ccm.

Les proportions de ce mélange ont été souvent modifiées, par exemple :

Liquide de Müller	5 ccm.
Formaline (4 %)	95 ccm.

Durée des fixations : 1-2-3 jours, pour des fragments ayant 5 mm. d'épaisseur. Le liquide est renouvelé chaque jour, 2-3 fois, jusqu'à ce que le liquide reste clair.

2. *Le liquide de Dominici* :

Sol. aq. sat. de HgCl_2	90 ccm.
Formol du commerce (40 %)	10 ccm.

Au moment de l'emploi, on ajoute quelques gouttes de teinture d'iode, jusqu'à coloration vin Porto de ce liquide. Temps de fixation : 24 heures pour des fragments toujours de même épaisseur. Après 12 heures, on renouvelle le liquide. Fixation à la température constante de 35° C., à l'étuve. On peut aussi, et les résultats ne sont pas moins bons, se passer de la teinture d'iode ainsi que de l'étuve, pour la fixation de la moelle osseuse.

3. *Liquide de Schaudinn* :

Sol. aq. sat. de HgCl_2	100 ccm.
Alcool 95 vol. %	50 ccm.

Les fragments y demeurent 24 heures dans ce premier liquide. Puis on le renouvelle et on les laisse encore une fois 24 heures ou davantage. Les tissus anatomiques se conservent fort bien dans ce fixateur, pendant des semaines.

4. *Le liquide de Bouin* (modifié par P. Masson) :

Formol du commerce	10 ccm.
Ac. acét. glacial	2 ccm.
Eau	30 ccm.
Ac. picrique à saturation.	

Les fragments y séjournent 2-3-4 jours et plus, mais en tout cas 2 jours. Le deuxième jour, on renouvelle le liquide. Ce liquide est aussi un très bon fixateur.

5. *Le liquide de Zenker* (modifié dans ce sens que l'on emploie du bichromate de potasse tout court en place du liquide de Müller) :

Sublimé corrosif	5,0 gr.
Bichromate de potasse	2,5 gr.
Eau dist.	100,0 ccm.

Au moment de l'emploi, on ajoute 10 % de formol (Papenheim-Maximow). Durée de fixation : 24-36 heures.

6. *Liquide de van Gehuchten :*

Alcool absolu	15 ccm.
Chloroforme	7,5 ccm.
Ac. acét. cristall.	2,5 ccm.

Durée de fixation 12 heures. Renouveler le liquide au bout de la 6^e heure.

7. *Liquide de van Gehuchten modifié :*

Acétone	15,0 ccm.
Chloroforme	5,0 ccm.
Ac. acét. crist.	2,0 ccm.

Même durée de fixation.

8. *Liquide de Carnoy :*

Sublimé corrosif à sat. dans H₂O dist. 100 cm.

Dissoudre à chaud (60-70° C) ; laisser refroidir. Filtrer.

Ac. acét. cristallisable 5 ccm.

Durée de fixation : 24-36 heures. Le liquide est renouvelé après la douzième heure.

9. *Liquide de Pappenheim :*

Alcool méthylique	50 ccm.
Acétone	20 ccm.
Formol (40 %)	10 ccm.

Dans toutes nos fixations, le liquide fixateur se trouvait en abondance, au moins 40-50 fois le volume des fragments à fixer.

Après chaque fixation, à l'exception de celles des n^{os} 6 et 7, les morceaux de moelle osseuse ont été rincés à l'eau courante, pendant 12-18-24 heures, suivant la fixation. Les fragments du liquide n^o 6 ont été lavés avec de l'alcool éthylique à 95 vol. %, et ceux du n^o 7 avec de l'acétone pendant une demi-heure.

C. Préparatifs pour l'inclusion : la déshydratation et la pénétration des fragments par un solvant de la paraffine.

a) *Déshydratation :* Après la fixation, chaque fragment de moelle osseuse a été durci et déshydraté, soit avec de l'alcool éthylique à concentration croissante, soit avec de l'acétone aussi à concentration croissante, ceci pour éviter que le tissu médullaire se ratatine trop : dans de l'alcool ou acétone à 50 vol. %, les fragments y demeuraient 2 h.

»	»	»	70	»	»	»	2
»	»	»	85	»	»	»	2
»	»	»	95	»	»	»	3

dans l'alcool absolu ou acétone pure I, » » 12 »

» » » » II, » » 6 »

Les fragments lavés avec l'alcool ou l'acétone sont directement portés les premiers dans l'alcool à 95 vol. %, les seconds dans l'acétone

aussi à 95 vol. %. Dans l'alcool absolu ou acétone pure, nous les avons laissés 6 heures dans le 1^{er} et 6 heures dans le 2^e bain.

b) *Pénétration des fragments par un solvant de la paraffine* : Après ces manipulations, nous avons porté nos fragments, soit dans du toluol, soit dans du xylol, liquides miscibles à la paraffine, ceci pour les éclaircir et les préparer à la pénétration de la paraffine que nous avons choisie comme milieu à inclure. Il faut avoir soin de bien enlever toutes traces d'alcool en laissant séjourner les morceaux assez longtemps dans un de ces liquides. Cette précaution n'est pas à prendre avec les fragments de moelle déshydratés dans l'acétone qui est aussi miscible à la paraffine liquide sans donner lieu à des précipités. Nos temps de pénétration du solvant sont les suivants :

Dans Toluol I, demi-heure.

» II, demi-heure.

» III, 1 heure à 1 1/2 heure et plus, suivant le liquide fixateur utilisé. Il faut attendre juste assez longtemps pour que les fragments soient translucides comme du lard et éviter de les laisser dans le toluol ou le xylol plus qu'il ne faut, ceci pour empêcher qu'ils ne deviennent friables, état qui les rendrait impropres à la coupe. Parfois nous nous sommes servi de xylol en place du toluol. Le seul avantage qu'il y a à se servir du xylol, c'est qu'il éclaircit plus rapidement, mais rend aussi les pièces anatomiques plus friables et demande par conséquent une surveillance plus grande. Le xylol est en outre plus cher.

D. Inclusion dans la paraffine.

L'inclusion des fragments destinés à la microtomie a été faite dans un mélange de paraffine, stéarine, cire, selon les proportions indiquées par Altmann : paraffine 850 gr., stéarine 100 gr., cire 50 gr. Ce mélange fond à la température de 54° C. environ. Il est maintenu en fusion à l'étuve réglée à 56° C. Les fragments de moelle osseuse, sortis du toluol III, sont d'abord portés dans un mélange de paraffine d'Altmann et de toluol à parties égales. Ils y restent 2 heures, dans la même étuve réglée à 56° C. Puis, on les porte successivement dans trois bains contenant chacun le même mélange de paraffine d'Altmann. Dans le premier bain, les fragments restent 3 heures ; dans le deuxième bain, également 3 heures et enfin, retirés de la paraffine II, les fragments sont portés dans la paraffine III où ils demeurent 2 heures. Pour bien paraffiner, nous comptons au moins une heure par mm. d'épaisseur du fragment à inclure.

Finalement, on verse la paraffine liquide III dans des godets en porcelaine dont le fond a été préalablement enduit avec de la glycérine concentrée pour empêcher l'adhésion. On ne met qu'un fragment de moelle osseuse par godet pour faciliter la coupe. Le fragment a été submergé en y coulant la paraffine liquide lentement et sans interrompre le filet liquide comme si l'on versait de l'huile, pour

empêcher la formation de bulles d'air. On attend qu'une fine pellicule de paraffine solidifiée se soit formée à la surface du liquide versé. Puis, on plonge minutieusement le godet, en le tenant bien horizontal, sous l'eau de fontaine, ainsi la contraction de la paraffine se fera régulièrement en tous les points et la masse sera bien homogène. En observant ce petit détail, on est sûr que la surface du bloc reste bien plane et, les fragments d'organes inclus n'apparaîtront jamais au dehors ; tandis qu'en abandonnant tout simplement le godet contenant de la paraffine liquide à l'air pour attendre sa solidification, il se forme, peu à peu, au centre de la masse, un entonnoir, et, les morceaux pointeront. Sous l'eau, le bloc de paraffine se détachera du godet et nagera à la surface. On attend quelques minutes, et, le bloc est prêt à être coupé au microtome.

Avec de pareils fragments, bien paraffinés, nous avons toujours réussi à faire des coupes très minces. L'épaisseur de nos coupes de moelle osseuse variait entre 3,3-6,6 et 9,9 microns.

E. Collage des coupes.

Dans tous les cas, nous avons monté nos coupes sur les lames par attraction capillaire tout simplement. Cette méthode directe a un gros avantage. Nous évitons ainsi, lors de l'examen microscopique de la fine structure cellulaire, de commettre des erreurs grossières. Toute colle, en effet, utilisée dans la méthode indirecte, le plus souvent à base de blanc d'œuf et de glycérine, laisse toujours nécessairement un résidu, rarement homogène, le plus souvent granuleux. Cette colle intermédiaire sur laquelle repose la coupe prend aussi le colorant employé, et, au moment de l'examen microscopique, nous ne savons plus ce qui appartient réellement à la coupe, et ce qui est dû à la colle. Le seul inconvénient du procédé direct est qu'on perd plus de temps, il est vrai. Mais cette perte de temps est largement compensée par les résultats.

Collage par attraction capillaire : Pour que cette méthode réussisse, il faut avant tout avoir des porte-objets très propres. Toute lame doit être soigneusement nettoyée. Nous avons d'abord décapé nos lames à l'acide sulfurique, rincé à l'eau de fontaine, puis lavé à l'eau distillée, ensuite à l'alcool-éther à parties égales. La surface de la lame qui vient immédiatement en contact de la coupe ne doit plus être touchée avec les doigts, ceci pour éviter un dépôt de matières grasses qui empêchent une bonne adhésion de la coupe. Toutes les lames nécessaires étant préalablement préparées comme nous venons de l'exposer, on chauffe de l'eau, à 45° C. environ, et, on la maintient à cette température. Sur la surface de cette eau tiède, on dépose coupe par coupe avec leur face brillante en contact du liquide. Instantanément les coupes s'étalent, se déroulent à l'occasion. Au moyen de lames nettoyées, on pêche ces coupes en s'aidant éventuellement d'une aiguille à dissocier pour mieux les charger. Une fois le porte-objet

retiré de l'eau, la coupe adhère par capillarité. On essuie l'eau tout autour de la coupe et on place les lames chargées, verticalement. On enlève, au bout d'un moment, à l'aide d'un papier buvard les dernières traces d'eau qui s'est amassée vers les parties déclives de chaque coupe. Pour terminer, on porte ces lames dans un thermostat réglé à 37° C. pour bien les sécher. Il est indiqué de les y laisser toute la nuit, ainsi nous n'aurons pas la surprise désagréable de voir se détacher les coupes au moment des diverses manipulations de la coloration.

Coloration des mégacaryocytes en coupe.

A. Méthode permettant de mettre les granulations des mégacaryocytes nettement en évidence :

Les coupes épaisses de 3,3 μ provenant de fragments fixés par le liquide de Dominici ont été déparaffinées avec du xylol, pendant 30-45 minutes à la température du laboratoire.

Nous les avons ensuite portées dans un second bain de xylol, pour bien enlever les dernières traces de paraffine (5 minutes). Puis, successivement dans les liquides suivants :

Alcools à concentration décroissante (95-85-75-60 vol. %).

Sol. diluée de teint. d'iode (1 cm³ de teint. d'iode à 10 % sur 100 ccm. d'alcool à 60 vol. %), 10 minutes.

Sol. d'hyposulfite de soude à 0,5 % dans l'eau dist., 10 minutes.

Eau dist. neutre 10 minutes.

» » » 5 »

On colore avec l'azur-éosine de Grüber (colorant composé de Giemsa-Romanowski) à raison de 1-1 ½ goutte de la sol. toute prête par ccm. d'eau dist. neutre ; temps de coloration : 1-2 heures.

On lave à l'eau dist. neutre. On sèche par agitation à l'air. On différencie avec acétone 30-40-60 secondes.

On plonge pour finir, les préparations successivement dans les liquides suivants :

1. Acétone 95 ccm. + xylol 5 ccm.

2. » 70 » + » 30 »

3. » 50 » + » 50 »

4. xylol 100 %.

Baume de canada neutre (Kahlbaum).

Lamelle.

Nous sommes arrivé au même résultat en ne passant pas nos coupes, fixées avec des liquides contenant du sublimé, dans la teinture d'iode diluée ou dans la sol. de Lugol et dans la solution d'hyposulfite de soude.

Par ce procédé nous arrivons à mettre nettement en évidence les granulations des mégacaryocytes.

Si nous colorons de la même manière des coupes de fragments fixés avec le liquide de Schaudinn ou de Zenker ou de Carnoy, nous

obtenons aussi de belles granulations bien distinctes dans le cytoplasma des cellules géantes. Par contre, le mélange d'Orth (formaline plus liquide de Müller) ou la formaline seule (4 %) dont H. Schridde s'est servi, lors de ses recherches qui l'ont amené à la découverte de ces granulations, nous ont donné des résultats moins satisfaisants.

B. Coloration des coupes épaisses de 3,3 μ avec le bleu de méthylène Löffler et le bleu de Unna :

Nous nous sommes servi de solutions de bleu de méthylène Löffler diluées au $1/4$ - $1/2$ et de la sol. mère. Temps de coloration : variables de 30 secondes pour les sol. conc. à 2 minutes pour les diluées. Nous avons aussi essayé d'employer des sol. encore plus diluées (3 gouttes de la sol. Löffler par cm^3 d'eau dist.) : temps de coloration : demi-heure à une heure et plus.

A l'examen microscopique, jamais nous n'avons remarqué une nuance azurée dans le cytoplasma des mégacaryocytes.

C. Coloration des coupes minces de 3,3 μ avec des sol. de pyronine neutre ou faiblement basique :

Avec de pareilles solutions ($1/2$ -1 %) le protoplasma des mégacaryocytes ne nous a jamais montré une nuance rouge-brique (Ziegelrot). Toutes nos coupes ont été teintées uniformément en rouge.

D. Coloration des coupes minces de 3,3 μ avec une sol. aq. neutre de vésuvine : Concentration : $1/2$ -1 %.

Jamais, non plus, nous n'avons pu observer une teinte spéciale autre que le brun, dans le cytoplasma des cellules géantes de Bizzozero. Toutes nos préparations n'ont montré qu'une couleur brune.

E. Coloration des coupes minces de 3,3 μ avec une sol. aq. neutre de violet cristallisé : Concentration : $1/2$ %.

Nos coupes de moelle osseuse n'ont pas montré de nuance caractéristique non plus.

F. Coloration des coupes de 3,3 μ avec une sol. aq. neutre de safranine (0,5 %) :

Toutes les coupes colorées par cette matière colorante ont été teintées en rouge. Pas de nuance spéciale.

CONCLUSION

Nous pouvons dire qu'avec chaque moelle osseuse, prélevée peu d'heures après l'exitus, on trouve des granulations très serrées et de couleur lilas, avec le colorant composé de Giemsa, dans le cytoplasma des mégacaryocytes, à condition toutefois que les coupes de moelle osseuse aient une épaisseur convenable et proviennent de fragments de moelle osseuse bien fixés. Nous insistons sur le fait qu'il est absolument nécessaire de prélever la moelle osseuse dans les toutes premières heures après la mort, si l'on désire mettre en évidence ces granulations. D'après nos expériences, c'est sur des coupes de moelle osseuse prélevée 4 à 6 heures après l'exitus, que nous avons toujours remarqué les plus belles granulations, quels que soient les états pathologiques qui ont déterminé la mort. Ces derniers n'ont de l'influence que sur le nombre des mégacaryocytes. Un second fait non moins important qui découle de l'ordre de grandeur des granulations, c'est d'examiner des coupes très minces (optimum 3 à 4 micra) de moelle osseuse, ne dépassant en tout cas pas 5 micra (limite de visibilité pour bien distinguer ces granulations). Avec des coupes de 6,6 micra et plus, nous avons seulement vu que le cytoplasma des cellules géantes en question n'était pas tout à fait homogène, mais nous n'avons jamais distingué nettement des granulations dans ces éléments. Nous sommes porté à croire que ces granulations sont probablement encore plus petites que celles des myélocytes neutrophiles (ces dernières sont, en effet, encore nettement visibles sur des coupes de 6,6 micra).

D'après l'étude des matières colorantes que nous venons de faire, nous sommes persuadé que le protoplasma des mégacaryocytes présente, en préparations fraîches, après adjonction d'une solution de bleu de méthylène contenant de l'azur de méthylène, un phénomène de polychromasie et non pas de métachromasie dans le vrai sens que Ehrlich lui a donné.

En coupe, les mégacaryocytes ne présentent jamais, avec aucun des colorants dont il est fait mention au cours de ce travail, une coloration spéciale différente du colorant utilisé.

BIBLIOGRAPHIE

- Arnold, J.*: Zur Morphologie und Biologie der Zellen des Knochenmarkes. Virchows Archiv. Bd. 140, 1895.
- Arnold, J.*: Virchows Archiv, Bd. 93, 1883, Bd. 97, 1884.
- Arnold, J.*: Zentralbl. f. allg. Pathol. u. pathol. Anat. Bd. 21, 1910.
- Askanazy, M.*: Über das basophile Protoplasma der Osteoblasten, Osteoklasten und anderer Gewebszellen. Bd. 13, 1902.
- Askanazy, M.*: « Knochenmark » im I. Bd. 2 Teil des Handbuches für allg. Pathol. u. pathol. Anat., herausgegeben von Henke-Lubarsch. 1927.
- Askanazy, M.*: Virchows Arch. Bd. 220, 1915.
- Askanazy, M.*: Die bösartigen Geschwülste der in der Niere eingeschlossenen Nebennierenkeime. Beiträge z. pathol. Anatomie. Bd. XIV, 1893.
- Branca, A.*: La moelle osseuse. Précis d'histologie, 3^e éd.
- Calmette, Nègre et Boquet*: Les principales matières colorantes employées en technique microbiologique. Ch. VII, du Manuel technique de microbiologie. Ed. Masson, 1926.
- Demarbaix, H.*: Division et dégén. des cellules géantes de la moelle osseuse. La cellule. Tome 5, 1889.
- Ehrlich, P.*: Farbenanalytische Untersuchungen zur Histologie und Klinik des Blutes. Berlin, 1891.
- Firket et Bouille, J.*: Recherches sur le rôle phagocytaire des mégacaryocytes. Ann. d'anat. pathol. Tome 2, 1905.
- Foà, P.*: Beitrag zum Studium des Knochenmarkes. Zieglers Beitr. Bd. 25, 1899.
- Frey, H.*: Das Verhalten der Megakaryocyten im menschlichen Knochenmark u. deren Beziehung zum Gesamtorganismus. Frankfurter Zeitschr. für Pathol. Bd. 36, S. 419-469.
- Hayem*: Du sang et ses altérations anatomiques. Paris, 1889.
- Hayem*: Leçons sur les maladies du sang. Paris, Masson, 1900.
- Kaufmann, Ed.*: Lehrbuch der spez. pathol. Anatomie, 7^{te} Aufl. « Knochenmark ». S. 179-182.
- Krause, R.*: Enzyklopädie der mikrosk. Technik. Das Methylenblau u. Methylenazur. Das Pyronin. Das Krytall-violett. Bd. II, 1926, S. 1382-1390.
- Maximow, A.*: « Die Megakaryocyten » aus dem Handbuch der mikrosk. Anatomie des Menschen II/1. Herausgegeben von W. von Möllendorff.
- Michaelis, L.*: Metachromasie. Enzyklopädie der mikrosk. Technik, 3^{te} Aufl. Herausgegeben von R. Krause. Bd. II, S. 1376-1380.
- Nägeli, O.*: Blutkrankheiten u. Blutdiagnostik. 4^{te} Aufl., S. 210-211. Untersuchungen über die Herkunft der Blutplättchen. Zieglers Beitr. 52, 1911.
- Ogata*: Untersuchungen über die Herkunft der Blutplättchen. Zieglers Beitr. 52, 1911.

- Rosemann, R.* : Lehrbuch der Physiologie des Menschen. 14^{te} Aufl. Erster Bd., Entstehung u. Untergang der roten Blutkörperchen.
- Schridde H.* : Die Knochenmarks-Riesenzellen des Menschen. Anat. Hefte Bd. 33, H. 99, 1907.
- Schridde, H.* : Die Darstellung der Leukocytenkörnclungen im Gewebe. Zentrbl. f. allg. Pathol. u. pathol. Anat. Bd. 16, 1905.
- Schridde, H.* : Die blutbereitenden Organe, Lehrbuch der pathol. Anatomie ; herausgegeben von L. Aschoff, 2 Bd., 1923.
- Seifert, O. & Müller, F.* : Morphologische Bestandteile des Blutes. Taschenbuch der med. klinisch. Diagnostik. 1922. Verlag von Bergmann, München.
- Stöhr, jun.* : Handbuch der mikrosk. Anatomie des Menschen, 1928.
- Stöhr u. W. von Möllendorff* : Lehrbuch der Histologie, 1928.
- Testut, L.* : La moelle osseuse. Traité d'Anatomie humaine, 7^e éd. Tome I.
-

